



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**ENSAYO CLINICO INDIVIDUAL EN FASE I-IIa PARA CONOCER  
LA FACTIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL USO AUTÓLOGO DE  
CÉLULAS MADRE EXPANDIDAS (e-ASC) DERIVADAS DE LA  
GRASA EN EL TRATAMIENTO LOCAL DE LA INCONTINENCIA  
URINARIA TRAS CIRUGÍA RADICAL DE PRÓSTATA**

**TESIS DOCTORAL**

**SERGIO ALONSO Y GREGORIO**

**MADRID, 2015**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**ENSAYO CLINICO INDIVIDUAL EN FASE I-IIa PARA CONOCER  
LA FACTIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL USO AUTÓLOGO DE  
CÉLULAS MADRE EXPANDIDAS (e-ASC) DERIVADAS DE LA  
GRASA EN EL TRATAMIENTO LOCAL DE LA INCONTINENCIA  
URINARIA TRAS CIRUGÍA RADICAL DE PRÓSTATA**

**TESIS DOCTORAL**

**SERGIO ALONSO Y GREGORIO**

**DIRECTOR:**

**DR. MARIANO GARCÍA ARRANZ**

**MADRID, 2015**

**ENSAYO CLINICO INDIVIDUAL EN FASE I-IIa PARA CONOCER  
LA FACTIBILIDAD Y SEGURIDAD DEL USO AUTÓLOGO DE  
CÉLULAS MADRE EXPANDIDAS (e-ASC) DERIVADAS DE LA  
GRASA EN EL TRATAMIENTO LOCAL DE LA INCONTINENCIA  
URINARIA TRAS CIRUGÍA RADICAL DE PRÓSTATA**

Esta memoria se presenta para optar al grado de Doctor en la Facultad de Medicina de la  
Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Cirugía, por:

D. SERGIO ALONSO Y GREGORIO

**DIRECTOR DE LA TESIS:**

DR. D. MARIANO GARCÍA ARRANZ

PROFESOR ASOCIADO

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

## **AGRADECIMIENTOS**

Este ensayo clínico se ha podido desarrollar gracias en primer lugar a la existencia de financiación pública para la investigación biomédica, sin la cual sería imposible que la mayoría de los médicos que realizan actividad asistencial diaria pudieran dedicar el más mínimo esfuerzo a la investigación.

El profesor D. Damián García Olmo es la primera persona a la que debo agradecer la conclusión de esta Tesis Doctoral. Gracias a que implantó en el Hospital La Paz un grupo de investigación focalizado en la terapia celular fue posible iniciar este camino en el año 2009 con la obtención de financiación en la convocatoria del Instituto Carlos III. Debo agradecerle la facilidad con la que me abrió la posibilidad de incorporarme a esta línea de investigación y beneficiarme así de su experiencia y de un grupo de personas incluidas en su grupo de investigación imprescindibles para desarrollar este trabajo.

Debo agradecer al Servicio de Urología del Hospital La Paz, con el Dr. De la Peña Barthell como Jefe de Servicio, la posibilidad nada habitual de poder desarrollarme profesionalmente desde todos los puntos de vista de la especialidad urológica. Sin la disponibilidad de todos los resortes del Servicio de Urología no había sido posible realizar la enorme tarea de un ensayo clínico que culmina en esta Tesis Doctoral.

Debo agradecer al Dr. Fermin Bethencourt su enorme esfuerzo personal y su ejemplo como gran entusiasta de la investigación. No encuentro palabras suficientemente adecuadas para agradecer su disponibilidad y su apoyo.

Debo dedicar una mención especial al Dr. Mariano García Arranz, Director de esta Tesis, por ayudarme tanto en lo profesional, ofrecerse constantemente para ayudar y colaborar, ser el apoyo técnico imperturbable, exigente en los momentos adecuados y finalmente, un buen amigo. Estaré siempre agradecido.

Quiero mencionar a Sergio y María Estrella, mis padres, por haber sido capaces de introducir en mi cabeza el deseo y la necesidad de crecer, progresar y afrontar retos siempre desde la honestidad y el esfuerzo.

Cualquier persona que haya dedicado tantos años a un proyecto como este, es consciente de los sacrificios personales que exige y siempre son los más cercanos los que sufren sus consecuencias más amargas.

A Marta, mi mujer, por ser ese apoyo infatigable y una compañera eterna. A mis hijos, porque son el motivo para todo.

*A mis padres, Sergio y Maria Estrella, por su ejemplo de sacrificio y tesón*

*A Marta, y a nuestros hijos*

*Porque el trabajo es el mayor de los talentos*

## **INDICE**

<b>Agradecimientos</b>	<b>4</b>
<b>Indice de abreviaturas</b>	<b>10</b>
<b>Indice de Tablas</b>	<b>11</b>
<b>Indice de Figuras</b>	<b>12</b>
<b>1.- Introducción</b>	<b>13</b>
<b>1.1.- Epidemiología de la incontinencia urinaria</b>	<b>14</b>
<b>1.2.- Epidemiología de la incontinencia urinaria en el varón</b>	<b>15</b>
<b>1.3.- Incontinencia urinaria tras cirugía prostática</b>	<b>16</b>
<b>1.4.- Epidemiología del cáncer de próstata</b>	<b>18</b>
<b>1.5.- Análisis económico de la incontinencia urinaria</b>	<b>19</b>
<b>1.6.- Fisiología de la micción</b>	<b>20</b>
<b>1.6.1.- Inervación</b>	<b>20</b>
<b>1.6.2.- Neuroefectores</b>	<b>22</b>
<b>1.6.3.- Vías centrales</b>	<b>23</b>
<b>1.6.4.- Fases de almacenamiento y vaciamiento vesical</b>	<b>24</b>
<b>1.7.- Fisiopatología de la incontinencia urinaria</b>	<b>26</b>
<b>1.8.- Diagnóstico de la incontinencia urinaria</b>	<b>27</b>
<b>1.8.1.- Cuestionario SF-36</b>	<b>28</b>

1.8.2.- Cuestionario ICIQ-SF	29
1.8.3.- Test de la compresa (Pad Test)	30
1.8.4.- Estudio urodinámico	31
1.8.5.- Pruebas de imagen	35
1.9.- Tratamiento de la incontinencia urinaria	36
1.9.1.- Tratamiento conservador	36
1.9.2.- Tratamiento quirúrgico	38
1.9.2.1.- Tratamiento endoscópico	38
1.9.2.2.- Tratamiento mediante slings masculinos	41
1.9.2.3.- Sistema ProACT	43
1.9.2.4.- Esfínter urinario artificial (AMS 800)	44
1.10.- Terapia celular	45
1.10.1.- Recuerdo histórico	45
1.10.2.- Células células madre ( <i>stem cells</i> )	47
1.10.2.1.- Células madre embrionarias (ESCs)	49
1.10.2.2.- Células pluripotentes inducidas (iPS)	50
1.10.2.3.- Células madre adultas	51
1.10.3.- Células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASCs)	54
1.10.4.- Bioseguridad de las ASC	58
1.10.5.- Mecanismo de acción	61
1.10.6.- Obtención y cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo	62
1.10.7.- Incontinencia urinaria y ASC	64
1.10.7.1.- Estudios preclínicos	65



1.10.7.2.- Estudios clínicos	69
2.- Hipótesis de trabajo	72
2.1.- Hipótesis	73
2.2.- Objetivos	73
3.- Material y métodos	75
3.1.- Diseño del estudio	76
3.2.- Análisis estadístico	82
3.3.- Análisis de seguridad	83
4.- Resultados	85
4.1.- Reclutamiento – extracción celular	86
4.2.- Terapia celular	86
4.3.- Calidad de vida	93
4.4.- Efectos adversos	93
5.- Discusión	94
6.- Mirando al futuro	108
7.- Conclusiones	111
8.- Bibliografía	113

## **INDICE DE ABREVIATURAS**

- 1.- ASC: Célula madre de la grasa**
- 2.- AEMPS: Agencia española de medicamentos y productos sanitarios**
- 3.- ADSC: Célula madre derivada de la grasa**
- 4.- CEIC: Comité ético de investigación clínica**
- 5.- EnSC: Célula madre endotelial**
- 6.- ESC: Célula madre embrionaria**
- 7.- HSC: Célula madre hemopoyética**
- 8.- iPS: Células pluripotentes inducidas**
- 9.- MDSC: Células madre derivadas del músculo**
- 10.- MSC: Células madre mesenquimales**
- 11.- SVF: Fracción vasculoestromal**

## **INDICE DE TABLAS**

- 1.- Cuadro de tareas en cada visita**
- 2.- Evaluación miccional**
- 3.- Cuantificación incontinencia urinaria**
- 4.- Eficacia clínica: correlación Pad Test- Urodinamia**

## **INDICE DE FIGURAS**

- **Figura 1: Clasificación de las células madre según capacidad de diferenciación**
- **Figura 2: Estructura del tejido graso**
- **Figura 3: Mecanismo de acción de las células madre**
- **Figura 4: Porcentaje de los diferentes tipos celulares de la fracción vascular-estromal**
- **Figura 5: Evolución del Pad Test desde visita preimplante (V0) hasta visita final (V6)**
- **Figura 6: Flowchart**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

La incontinencia urinaria ha sido definida por la Sociedad Internacional de la Continencia (ICS) como cualquier pérdida involuntaria de orina que supone un problema higiénico o social. ([www.uroweb.org](http://www.uroweb.org))

El paradigma de los trastornos patológicos que suponen un problema fundamentalmente relacionado con la calidad de vida y que tiene un impacto mayúsculo en los Sistemas Sanitarios de las sociedades modernas, es la *incontinencia urinaria*.

### **1.1- Epidemiología de la incontinencia urinaria:**

El termino síntomas del tracto urinario inferior fue introducido en 1994 y recoge todos los síntomas urinarios relacionados con el almacenamiento, el vaciado urinario así como el periodo postmiccional. Un hecho evidente y comunicado en múltiples ocasiones es el aumento de la prevalencia de estos síntomas con la edad independientemente del genero. <sup>(1)</sup>

La prevalencia de los síntomas del tracto urinario inferior en hombres alcanza cifras del 62,5% y en las mujeres del 66,6%, sobre todo a partir de los 40 años de edad. En el varón la incidencia de todos estos síntomas aumenta aun más a partir de los 60 años. Debra y cols. en el 2006 cifra la incidencia especifica de síntomas de incontinencia urinaria para mujeres y hombres en 13,1% y 5,4% respectivamente, siendo lo mas frecuente los síntomas de incontinencia urinaria de esfuerzo para el grupo etario de las mujeres y “otra incontinencia” (no claramente de esfuerzo) para los varones. <sup>(2)</sup>

El grupo de síntomas mas frecuente registrado se refiere a los síntomas relacionados con el llenado/almacenamiento vesical de la orina, siendo de todos éstos el mas frecuente con diferencia la nicturia, propio de la vejiga hiperactiva. No obstante, casi el 50% de las mujeres con vejiga hiperactiva refieren incontinencia urinaria y el 28,7% en el caso de los hombres <sup>(2)</sup>. De aquellos que referían además incontinencia urinaria, en el caso de las mujeres el 28,7% referían incontinencia de esfuerzo pura y el 38,1% incontinencia mixta, mientras que en el caso de los varones el 29% referían “otro tipo de incontinencia” y el 19,4% incontinencia urinaria mixta. <sup>(2)</sup>

Un metanálisis del año 1997, registra la prevalencia media para la incontinencia urinaria en varones en el 14,5% (4,6%-24%), y en la mujeres en el 23,5% (4,5%-44%) <sup>(3)</sup>. En cualquier caso, es indiscutible el hecho de que la prevalencia de síntomas del tracto urinario inferior, y por ende de incontinencia urinaria, en la población general es enorme y constituye un problema de salud de primer orden.

### **1.2.- Epidemiología de la incontinencia urinaria en el varón:**

La epidemiología de la incontinencia urinaria en el varón ha sido menos estudiada que la femenina, registrando una incidencia de incontinencia urinaria menor que en la mujer con una relación estimada de 2:1 <sup>(2)</sup>. Por otro lado, si exigimos una homogeneidad en cuanto a estos estudios definida por la Sociedad Internacional de la Continencia (ICS) en relación a la definición de los síntomas, la recogida de los datos y la interpretación de los mismos, los hallazgos en la literatura merman considerablemente.

Existe por tanto, una importante heterogeneidad entre los escasos artículos publicados, siendo el primero en publicarse siguiendo los preceptos de la ICS el artículo de Debra Irwin en el 2006 <sup>(2)</sup>. Hasta entonces, la incidencia de incontinencia urinaria en el varón oscilaba entre el 3% y el 11%. Independientemente de la metodología, existe un consenso en el aumento de la incidencia de la incontinencia urinaria en el varón con la edad. La distribución de la incontinencia urinaria en el varón es del 40-80% para la incontinencia de urgencia, del 10-30% para la incontinencia mixta y <10% para la incontinencia esfuerzo pura. Hoy en día debemos hablar de síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) <sup>(2)</sup>. La urgencia miccional en el varón puede ser secundaria a patologías de la glándula prostática, infecciones o trastornos digestivos, que pueden resolverse con tratamiento específico e incluso mejorar sin tratamiento alguno.

De una manera global se han identificado una serie de factores de riesgo para el desarrollo de incontinencia urinaria en el hombre:

- Edad
- Presencia de STUI (*síntomas del tracto urinario inferior*)
- Trastornos cognitivos y funcionales
- Enfermedades neurológicas
- Cirugía prostática

### **1.3.- Incontinencia urinaria tras cirugía prostática:**

Aquellos varones con una patología prostática benigna subsidiaria de cirugía podrán ser sometidos a un procedimiento transuretral o por vía abdominal en función



del tamaño de la glándula. Las tasas de incontinencia urinaria en estos procedimientos son inferiores al 2%. No obstante, el volumen de pacientes sometidos a estos procedimientos es enorme. Se ha estimado que la tasa de incontinencia media tras cirugía abierta es del 0,5%, siendo de urgencia una media del 0,5% y de esfuerzo del 1,9% <sup>(4)</sup> . Por otro lado, en el caso de la cirugía transuretral, el 2,1% refieren incontinencia de esfuerzo, el 1,9% incontinencia de urgencia y el 1% incontinencia total. <sup>(5)</sup>

Tras prostatectomía radical por adenocarcinoma de próstata las tasas de incontinencia publicadas varían del 5% al 60% <sup>(6)</sup> . Las políticas de screening y diagnóstico precoz del cáncer de próstata desarrolladas en las últimas décadas con el advenimiento del PSA (Antígeno Prostático eSpecífico) han llevado a que la prostatectomía radical se constituya en uno de los procedimientos más frecuentes en la especialidad de urología.

Entre los factores más influyentes en la continencia tras la prostatectomía radical destacan la experiencia del cirujano y el tiempo transcurrido desde la intervención, registrando una mejora espontánea gradual durante al menos los 12 primeros meses posteriores a la cirugía <sup>(7)</sup> . En centros de excelencia se comunican tasas de continencia (definido por no llevar ningún tipo de compresa el paciente) tras cirugía radical de próstata a partir del año de la operación del 88%-95%.

Son muchos los estudios realizados para filiar claramente la causa de incontinencia urinaria tras prostatectomía radical. Ha sido claramente postulada la lesión del esfínter urinario como la causa principal dado su estrecha relación con el apex

prostático y su posible lesión durante el procedimiento quirúrgico. Los estudios urodinámicos realizados a grupos de pacientes sometidos a cirugía radical por cáncer de próstata han evidenciado que la causa es un déficit esfinteriano en la mayoría de los casos, afirmando en algunos autores que supone más del 95% de las causas. Otros trabajos han evidenciado que la presencia de síntomas de hiperactividad vesical es más frecuente y más relevante en la etiología de la incontinencia urinaria postquirúrgica de lo inicialmente sospechado, aunque no está claro si es consecuencia de la cirugía o un hecho presente previamente. En cualquier caso, e independientemente del papel de la hiperactividad vesical, la causa determinante es la presencia de un esfínter incompetente para contrarrestar las presiones vesicales, y por tanto, evitar la fuga de orina. <sup>(8,9)</sup>

#### **1.4.- Epidemiología del cáncer de próstata:**

Excluyendo los tumores de piel, el cáncer de próstata es hoy en día el cáncer más común en el ser humano. Se diagnostican a lo largo del mundo más de 660.000 nuevos casos cada año, lo que constituye el 10% de todos los nuevos cánceres del varón. El cáncer de próstata es el cáncer más numeroso diagnosticado en el hombre con 382000 nuevos casos en Europa durante el año 2008 (22,2% del total), seguido por el cáncer de pulmón (17%) y el colorrectal (13,5%). El cáncer de próstata constituye la tercera causa de muerte en hombres (89000; 9,3%) precedido por el cáncer de pulmón (26,6%) y el colorrectal (11,5%). En España la incidencia del cáncer de próstata ha variado desde el 1,3% antes de 1990 hasta el 7,3% durante el periodo 1975-2004. <sup>(10,11)</sup>

En el 2008 se estimó que la incidencia de cáncer de próstata en los Estados Unidos fue de 186.300 nuevos casos, lo que corresponde con el 25% de todos los

cánceres en el varón, seguido por el cáncer de pulmón que supuso el 15%. Según dicha estimación el cáncer de próstata en este país supone una tasa de mortalidad de 28660 casos al año, que corresponde con el 10% de todas las muertes por cáncer en el hombre, tan sólo precedido por el cáncer de pulmón que constituye el 31%. Se estima que en USA en el año 2015 estas cifras alcanzarán los 280000 casos de cáncer de próstata por 270000 de cáncer de pulmón, y en el 2025 serán 350000 y 300000 respectivamente. <sup>(10)</sup>

### **1.5.- Análisis económico de la incontinencia urinaria:**

Para abordar los costes sanitarios se han desarrollado diversos sistemas de análisis que enmarcamos de una forma global en tres: análisis coste-efectividad, análisis coste-utilidad y análisis coste-beneficio. Además, se generarán una serie de costes sanitarios directos y otros indirectos.

Los costes sanitarios directos incluyen los costes relacionados con el diagnóstico, tratamiento, cuidados rutinarios y los derivados de una patología dada. Estos costes en general son más fáciles de recoger y analizar, pese a las carencias de los sistemas de análisis de costes.

Cuando hablamos de costes indirectos, es aún más complejo de analizar puesto que se refiere al tiempo perdido en relación a una patología dada. Dado que la incontinencia urinaria no se asocia con una muerte prematura, los gastos indirectos se refieren a la pérdida de productividad en el trabajo del paciente como consecuencia de su incontinencia, en términos de abstención laboral así como de eficiencia laboral. Evidentemente, éste es un análisis aún más complejo.

En diversos países, existen análisis de costes secundarios a la incontinencia urinaria en general, pero apenas existen en relación al caso concreto de la incontinencia de esfuerzo. Por el contrario, sí existen análisis específicos de los costes asociados a la vejiga hiperactiva probablemente por su elevada prevalencia. En USA se estimó en 16 billones de dólares, con un incremento estimado de los mismos en los próximos 10 años del 250%. En 1997 el Instituto Nacional de Salud americano cifró los costes anuales directos relacionados con la incontinencia urinaria en 17,5 billones de dólares. Dichos costes resultan comparables con los gastos sanitarios del tratamiento de cáncer de pulmón y ginecológicos en las mujeres en el mismo año (11,1 billones), la osteoporosis (13,8 billones), neumonía y gripe (15,8 billones) y la artritis (17,6 billones). Este constituye un ejemplo demoledor sobre los costes sanitarios de la incontinencia urinaria.<sup>(12)</sup>

## **1.6.- Fisiología de la micción:**

### **1.6.1.- Inervación:**

En el mecanismo de la micción intervienen los sistemas simpático, parasimpático y somático. Existen una serie de arcos reflejos que permiten el normal mecanismo de la micción tanto en su fase de almacenamiento como en su fase de vaciamiento. Globalmente todas estas conexiones están bajo control central a través de conexiones desde la médula al tronco del encéfalo y córtex entre otros.

Existen receptores de tensión y contracción ubicados en las fibras de colágeno y distribuidos por todo el músculo detrusor. Igualmente, existen receptores exteroceptivos

(táctiles, dolorosos y térmicos) distribuidos por todo el urotelio y la submucosa. Toda esta información aferente es vehiculizada a los centros medulares a través de los nervios pudendo, hipogástrico y pélvico:

- 1.- Centro simpático: T<sub>10-12</sub> – L<sub>1</sub>
- 2.- Centro parasimpático: S<sub>2</sub>-S<sub>4</sub>
- 3.- Centro somático: S<sub>3</sub>-S<sub>4</sub>

A través del nervio pudendo se ejerce un control voluntario sobre los esfínteres uretral y anal. El control involuntario viene regido por el Sistema Nervioso Vegetativo o Autónomo, es decir, los Sistemas Nerviosos Simpático y Parasimpático. El sistema parasimpático a través del nervio erector o pélvico inerva el músculo detrusor de la vejiga, mientras que el sistema simpático a través del nervio hipogástrico inerva el trigono y el cuello vesical (esfínter urinario interno).

La vía eferente motora somática que nace en el núcleo pudendo de Onuf en S<sub>3-4</sub> a través del nervio pudendo inerva los esfínteres uretral externo, anal y la musculatura del suelo de la pelvis, cuya función es inducir el cierre de los esfínteres y de la musculatura pelviana asegurando la continencia. Las eferencias simpáticas que nacen en las raíces anteriores T<sub>10</sub>-L<sub>1</sub> atraviesan los ganglios paravertebrales sin establecer sinapsis para constituir el nervio presacro, que a nivel de la vértebra S<sub>1</sub> se divide en dos nervios hipogástricos que se integrarán en los dos plexos hipogástricos que contienen los ganglios donde establecen la sinapsis y cuyos axones neuronales postganglionares atravesarán los ganglios parasimpáticos pélvicos (sin sinapsis) alcanzando la vejiga y la uretra proximal. Su función es asegurar la continencia durante la fase de llenado vesical

mediante la contracción del trigono y cuello vesical. Las eferencias parasimpáticas que nacen de las raíces anteriores de S<sub>2</sub>-S<sub>4</sub> constituyen los nervios pélvicos o erectores que constituirán parte del plexo hipogástrico para establecer sinapsis en los ganglios pélvicos de la pared vesical, donde establecerán sinapsis para finalmente inervar la vejiga y la uretra proximal. Su función es garantizar el vaciado vesical mediante la contracción del detrusor.

### **1.6.2.- Neuroefectores:**

A nivel de las estructuras que hacen posible el mecanismo de la micción se distribuyen distintos receptores que permiten el desarrollo del control neurológico. Así, a nivel del detrusor existen neuroefectores parasimpáticos que son fundamentalmente muscarínicos, y que se ubican a lo largo de todo el detrusor con la excepción del trigono. Igualmente, nos encontraremos con neuroefectores simpáticos, que son receptores  $\beta$  que se encuentran en todo el detrusor salvo el trigono y el cuello vesical, y receptores  $\alpha$  que se ubican en el trigono y el cuello de la vejiga.

De esta forma, el estímulo de los receptores muscarínicos por vía parasimpática a través del nervio pélvico, inducen a la contracción del músculo detrusor en la fase de vaciado vesical. Por el contrario, el estímulo de los receptores  $\beta$  por vía simpática a través de los nervios hipogástricos, da lugar a la relajación del músculo detrusor durante la fase de llenado vesical. Igualmente, el estímulo simpático a través del nervio hipogástrico de los receptores  $\alpha$  dan lugar a la contracción del trigono y cuello vesical (esfínter interno), necesarios para la continencia durante la fase de llenado vesical. A

nivel del esfínter estriado externo, existen receptores colinérgicos cuyo estímulo produce la contracción del esfínter.

Recientes estudios de inmunohistoquímica indican que el esfínter estriado uretral recibe inervación triple simpática, parasimpática y somática.

### **1.6.3.- Vías centrales:**

Son varias las áreas centrales implicadas en el mecanismo de la micción. Sin embargo son el área motora del detrusor en el córtex y el núcleo Pontino los responsables del control consciente y voluntario de la micción.

El área cortical del detrusor o córtex prefrontal medial se localiza en la porción superomedial del lóbulo frontal. La información aferente desde los receptores vesicales alcanza el córtex frontal, y desde aquí viajan hasta los ganglios de la base y la formación reticular. La información eferente que nace en el córtex es transmitida al núcleo Pontino para finalmente alcanzar los núcleos medulares simpático, parasimpático o somático, y de esta forma realizar un control sobre los reflejos de la micción.

En el núcleo Pontino se distinguen dos zonas funcionalmente distintas: núcleo tegmental dorsal y núcleo tegmental ventral. El núcleo dorsal se conoce como núcleo de Barrington, centro Pontino de la micción o región M. Establece eferencias con el núcleo parasimpático sacro responsable de la contracción del músculo detrusor y de la relajación del esfínter uretral interno, y por tanto implicado en la fase de vaciado vesical. El núcleo ventral, conocido como centro Pontino de la continencia o región L,

emite eferencias hacia la motoneurona del núcleo somático o de Onuf en la médula sacra, responsable de la contracción de los esfínteres uretrales, y por tanto implicado en la fase de llenado vesical.

De manera sencilla, podemos decir que el núcleo simpático controla el esfínter interno a través del nervio hipogástrico, que el núcleo parasimpático controla el músculo detrusor a través del nervio pélvico, y que el núcleo somático controla el esfínter externo a través del nervio pudendo. Todo ello bajo el control del centro pontino de la micción que regula el mecanismo de la micción en las fases de llenado y vaciado vesical. El momento adecuado de la micción viene controlado por las funciones superiores que pueden inhibir el reflejo de la micción hasta el momento que se considere socialmente adecuado.

#### **1.6.4.- Fases de almacenamiento y vaciamiento vesical:**

Se puede decir que en el ser humano el normal mecanismo de continencia y micción depende de la integridad de las siguientes vías neuronales:

- Nervios pélvico y pudendo
- Nervios sensitivos lumbosacros
- Substancia gris periacueductal
- Centros pontinos de la micción y de la continencia
- Interneuronas inhibitorias sacras
- Motoneuronas de la vejiga y el esfínter uretral.



Todas estas estructuras son las responsables del correcto equilibrio entre las dos fases fundamentales del proceso de la micción: fases de llenado y de vaciado vesical.

El músculo detrusor de la vejiga contiene un 70% de elementos elásticos, las fibras musculares, y un 30% de elementos viscosos, fibras colágenas. Las primeras tienen la característica de regresar a la situación inicial cuando cede la fuerza a la que están sometidas, mientras que las segundas, por el contrario retrasan su deformación al ser sometidos a una tensión. Durante la fase de llenado, las fibras musculares se adaptan al aumento paulatino del volumen sin apenas aumentar la presión gracias a sus características elásticas, hasta que alcanzan su límite, y entran en juego los elementos viscosos de la vejiga. El tono muscular vesical es el que mantiene la tensión constante a pesar del aumento del volumen entre micción y micción, lo que conlleva varias horas. El tono muscular es una propiedad intrínseca al músculo liso, y por tanto independiente del control neurológico.

La fase de vaciado viene definida por la capacidad de la vejiga de vaciar todo su contenido y se inicia cuando los elementos colágenos alcanzan su límite fisiológico y se inicia el arco reflejo de la micción. A diferencia de la fase de almacenamiento, la fase de vaciado vesical viene activada por el control neurológico que desencadena la contracción del detrusor para vaciar el contenido vesical.

El mecanismo de la micción exige, por tanto, no sólo la integridad del sistema nervioso central y periférico, si no también la integridad de los componentes de la vejiga.

### **1.7.- Fisiopatología de la incontinencia:**

Para encontrarnos ante una situación de continencia se tienen que dar los siguientes requisitos:

- Vejiga de buena capacidad que permita una fase de llenado sin elevadas presiones.
- Mecanismos de cierre uretral anatómicamente normales y funcionalmente competentes.
- Integridad del sistema nervioso central y periférico.

Se han identificado una serie de factores de riesgo para desarrollar incontinencia urinaria en el varón:

- Edad
- STUI
- Deterioro funcional y cognitivo
- Trastornos neurológicos
- Cirugía prostática

La comisión sobre cáncer de la Asociación Americana de Cirujanos publicó en 1993 sobre un total de 2122 pacientes intervenidos de cáncer de próstata en 484 centros de los cuales tan sólo el 58% de los pacientes estaban completamente continentes <sup>(13)</sup> . Estos resultados fueron posteriormente desmentidos por Walsh quien publicó que la tasa

de incontinencia urinaria tras prostatectomía radical oscilaba entre el 2% y el 5%, y que tan sólo entre el 0% y el 0,5% requerirían un esfínter urinario artificial <sup>(14)</sup> . Finalmente, la ICI revisó sus datos y concluyó que en *centros de excelencia* las tasas de continencia varían entre el 88% y el 95%.

La reunión internacional de incontinencia también ha concluido que la principal causa de incontinencia tras prostatectomía radical es la lesión esfinteriana. Ya en la década de los 90 se publicaron evidencias al respecto. Así, Chao publicó mediante estudios de videourodinamia sobre 74 pacientes que la debilidad del esfínter está presente en el 96% de los casos de incontinencia urinaria tras cirugía radical de próstata<sup>(9)</sup> . Igualmente, estudios electromiográficos demostraron, incluyendo una mayoría de pacientes continentes tras la cirugía, una pérdida de unidades motoras esfinterianas y una disminución de la actividad electromiográfica. <sup>(15,16)</sup>

### **1.8.- Diagnóstico de la incontinencia urinaria:**

El diagnóstico de la incontinencia urinaria se apoyará en dos pilares principales. En primer lugar la constatación tanto mediante la anamnesis, la exploración física y pruebas complementarias de la existencia de una incontinencia urinaria, así como del tipo de incontinencia al que corresponde. En segundo lugar, el impacto de la incontinencia urinaria en la calidad de vida de los pacientes. El impacto sobre la calidad de vida será determinante en la decisión terapéutica consiguiente. Son muchos los cuestionarios disponibles con este propósito, y con diversos diseños en función del objetivo particular a evaluar. En este estudio nos hemos decantado por dos cuestionarios de larga trayectoria e implantación universal: SF-36 y ICIQ-SF

### **1.8.1.- Cuestionario SF-36:**

El cuestionario de calidad de vida SF-36 fue desarrollado a principios de los años noventa en los Estados Unidos, para su aplicación en el Estudio de los Resultados Médicos (Medical Outcomes Study, MOS). Está compuesto por una batería de 36 preguntas que valoran los estados tanto positivos como negativos de la salud. Se desarrolló a partir de una extensa batería de cuestionarios empleados en el MOS que incluían 40 conceptos relacionados con la salud.

Los 36 ítems del instrumento abarcan las siguientes escalas: Función física, Rol emocional y Salud mental. Adicionalmente, el cuestionario incluye una pregunta sobre el estado de salud respecto al año anterior, que no se utiliza para el cálculo de ninguna de las escalas, pero que proporciona información útil sobre el cambio de salud percibido por el paciente en el último año.

Sus buenas propiedades psicométricas, que permiten la comparación de resultados, lo convierten en uno de los instrumentos con mayor potencial en el campo de la *calidad de vida relacionada con la salud*. Todas estas características impulsaron a su adaptación en la lengua española, siendo desde su primera adaptación en 1995, tanto en la versión estándar del SF-36 como en su versión reducida SF-12, un instrumento tremendamente útil de la evaluación de resultados en nuestro medio. <sup>(17)</sup>

Los estudios publicados sobre las características métricas de la versión española del SF-36 aportan suficiente evidencia sobre su fiabilidad, validez y sensibilidad. Estos resultados son consistentes con el documento original, lo que demuestra que la versión

española es equivalente y por tanto, puede ser empleada en estudios nacionales e internacionales.

Este cuestionario alberga un grado de recomendación A por la ICI como herramienta para evaluar el estado de general de la salud para pacientes con incontinencia. ([www.ici.org](http://www.ici.org))

### **1.8.2.- Cuestionario ICIQSF:**

Este es un cuestionario específicamente diseñado para evaluar la frecuencia, la severidad y el impacto de la incontinencia en la calidad de vida, y recientemente su versión corta ha sido validada y publicada, así como traducida a un total de 30 lenguas diferentes, incluidas la española <sup>(18)</sup>. Está constituido por 4 preguntas asignando a las respuestas de las 3 primeras un valor numérico, y siendo la cuarta multirespuesta. La puntuación se obtiene sumando las respuestas de las 3 primeras preguntas y se considera diagnóstico de incontinencia urinaria cualquier puntuación superior a 0.

El ICIQSF es avalado por una recomendación grado A por el comité de registro de síntomas y calidad de vida de la tercera reunión del ICI (International Consultation on Incontinence) en el 2004. ([www.ici.org](http://www.ici.org))

Se ha demostrado su eficacia tanto en la administración directa por el profesional sanitario como en la autoadministración por el propio paciente, obteniendo los mismos resultados, lo que lo convierte en un excelente cuestionario a tales efectos. <sup>(19)</sup>

### **1.8.3.- Test de la compresa (Pad test):**

El test de la compresa persigue cuantificar objetivamente el grado de incontinencia, y por tanto, su severidad. Se han descrito fórmulas imprecisas en base tanto a los síntomas como al número de absorbentes que emplea el paciente, y que nos permite clasificar la incontinencia de forma grosera en leve, moderada y severa.

Dada esta imprecisión diversos autores han intentado desarrollar una clasificación cuantitativa. La mera medida del peso de las compresas perineales para estimar las pérdidas urinarias fue introducido por Sutherst y cols en 1981 y por Walsh y Mills en 1984. El inconveniente era que estos métodos no eran bien estandarizados por lo que Bates y cols en 1983 desarrollaron el test de la compresa en 1 hora de forma estructurado y en 1988 fue asumido por la Sociedad Internacional de Continencia <sup>(20)</sup>. Posteriormente fueron descritos el test de la compresa para 24 horas y para 48 horas. En general, se distinguen 4 tipos de test de la compresa: <1hora, 1 hora, 24 horas y 48 horas. En 1985, Jorgensen y cols, demostraron que el test de la compresa de 24 horas desarrollado a domicilio durante las actividades cotidianas, es más sensible que el test de 1 hora con un volumen vesical estandarizado de 200-300 ml. Del mismo modo, demostró una correlación positiva entre dos test de 24 horas a domicilio y sus resultados fueron estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ). <sup>(20, 21)</sup>

Como resultado de las distintas publicaciones en relación al test de la compresa podemos concluir que el test de 24 horas es el más útil para cuantificar las pérdidas de orina.

A modo de resumen exponemos sus ventajas:

- Se correlaciona bien con los síntomas de incontinencia
- Posee una buena reproducibilidad
- Un peso  $\geq 4$  gr se considera un test positivo.
- La realización de test de mas de 24 horas de duración aporta escasa ventajas.

#### **1.8.4.- Estudio urodinámico:**

La valoración urodinámica comprende el estudio de la función/disfunción del almacenamiento y evacuación de las vías urinarias inferiores.

La incontinencia urinaria es esencialmente un trastorno de la fase de llenado, aunque ocasionalmente puede ser consecuencia de una alteración de la fase de vaciado, como sucede en la obstrucción crónica infravesical y en la disinergia vesico-esfinteriana.

Las pruebas urodinámicas realizadas habitualmente son:

- a) Flujometría urinaria
- b) Cistomanometría
- c) Estudios de presión flujo
- d) Perfil de presiones uretrales
- e) Electromiografía
- f) Videourodinamia

Es fundamental que las pruebas urodinámicas reproduzcan los síntomas que presenta el paciente de manera fiable, si no es así, no será válido como herramienta diagnóstica.

a) Flujometría urinaria:

De una forma no invasiva determina las características del flujo urinario durante la fase de vaciado miccional, y viene definida por tres variables: la presión del detrusor, la permeabilidad uretral y la relajación del esfínter.

Su aplicación fundamental es la valoración de la obstrucción infravesical, puesto que valora la fase de vaciado.

Se aceptan que volúmenes evacuados por debajo de 150 ml generan datos imprecisos. Así, valores de Qmax (flujo máximo) inferiores a 10-12 ml/sg se asocian con una elevada probabilidad de obstrucción infravesical, flujos entre 12-15 ml/sg se asocian con escasa probabilidad de obstrucción, mientras que flujos superiores a 15 ml/sg la probabilidad es muy baja.

b) Cistomanometría:

Consiste en el registro simultáneo de la presión vesical y abdominal durante la fase de llenado vesical. Se considera la pieza fundamental de la urodinamia.



Se introduce un catéter intravesical tipo transductor de agua (calibre 8-12 Chárriere) que relaciona los cambios de presión en la fase de llenado vesical con el aumento de volumen, la distensibilidad vesical. Por otro lado, se introduce una sonda rectal que es un transductor de presión, y que corresponde a la presión abdominal. De este modo, permite discernir si los cambios de presión vesical son debidos exclusivamente a contracciones del músculo detrusor de la vejiga o también a la actividad voluntaria de la musculatura abdominal.

Durante esta exploración se registra automáticamente por el equipo:

- Presión vesical: presión total en el interior de la vejiga
- Presión abdominal: Presión alrededor de la vejiga
- Presión del detrusor o sustraída: restando la abdominal de la vesical, y es el componente de la presión vesical creada por las fuerzas activas y pasivas de la pared vesical.

Cualquier elevación del detrusor involuntaria asociada a urgencia miccional, se califica como contracción no inhibida del detrusor. Se denomina detrusor hiperactivo a aquel músculo detrusor que se contrae, bien de forma espontánea o bien con maniobras de provocación, mientras el paciente intenta inhibir la micción.

c) Estudios de presión-flujo:

Miden simultáneamente la presión vesical y el flujo miccional durante la fase de

vaciado. El objetivo fundamental es valorar la existencia de obstrucción infravesical, y diferenciarla de la disminución de la contractilidad vesical.

*d) Perfil de presiones uretrales:*

La perfilometría de la presión uretral consiste en la medición de la presión intraluminal a lo largo de la longitud de la uretra. Mide la presión de la uretra del paciente en cada punto, así como la transmisión de la presión abdominal a la uretra.

Se puede medir de dos formas: perfil en reposo y perfil dinámico. El dinámico, además de medir la presión de la uretra durante la fase de llenado, se valora también durante test de provocación (valsalva, tos, etc), lo que permite valorar la presión de cierre uretral.

Registros obtenidos con perfilometría en reposo:

- Presión uretral máxima: la máxima presión recogida durante el perfil.
- Presión uretral de cierre máxima: diferencia entre la presión uretral máxima y la presión vesical.
- Presión vesical: presión existente en la vejiga al comenzar la perfilometría.
- Longitud funcional de la uretra: longitud de la uretra durante la cual la presión uretral supera a la vesical.

Durante la perfilometría dinámica se registrarán además:

- Uretra funcional dinámica: longitud de la uretra en la que la presión uretral supera a la vesical durante la tos o la maniobra de valsalva.
- Cociente de transmisión de presión: incremento de la presión uretral durante la tos como porcentaje del incremento de la presión vesical obtenido simultáneamente.

La perfilometría dinámica es, por tanto, la prueba fundamental durante el estudio de la incontinencia urinaria de esfuerzo, puesto que los aumentos de la presión uretral durante los aumentos de la presión vesical como consecuencia de la tos o la maniobra de valsalva, son los que evitan los escapes de orina durante el esfuerzo. Cuando no se producen estos aumentos de presión uretral se produce el escape, y por tanto está presente una incontinencia urinaria de esfuerzo.

#### **1.8.5.- Pruebas de imagen**

Se han utilizado diferentes métodos diagnósticos radiológicos para evaluar la incontinencia, pero ninguno ha demostrado su aportación imprescindible. Se ha utilizado clásicamente la cistouretrografía miccional (CUMS) para valorar la anatomía vesical, las relaciones del cuello con la pelvis, su posición y la presencia de cistocele asociado. Con propósito parecido también se ha utilizado la ecografía y más recientemente la resonancia magnética.

En general, su mayor aportación es ante la presencia asociada de prolapsos de órganos pélvicos en la mujer, y en el varón para la evaluación del estado de la uretra previo a un tratamiento quirúrgico. No son, por tanto, herramienta diagnósticas imprescindibles actualmente.

### **1.9.- Tratamiento de la incontinencia urinaria:**

El abordaje terapéutico de la incontinencia urinaria se realiza desde varios enfoques pudiendo ofertar distintas modalidades terapéuticas en función del tipo de incontinencia, su severidad y las preferencias del paciente. Así, para el tratamiento de la incontinencia urinaria masculina podemos ofrecer un tratamiento conservador y un tratamiento quirúrgico. Dentro de las opciones terapéuticas quirúrgicas podemos ofrecer abordajes endoscópicos y abordaje quirúrgicos clásicos.

#### **1.9.1.- Tratamiento conservador:**

El primer paso en el manejo conservador de la incontinencia urinaria constituye cambiar hábitos de vida y dietéticos.

El manejo conservador de la incontinencia urinaria incluye la abstención de tratamientos activos y el empleo de instrumentos para evitar las pérdidas de orina como son portar sonda vesical, emplear colectores urinarios externos así como el uso de pinzas compresoras del pene y la uretra que evitan las pérdidas urinarias. Obviamente, no tienen intención curativa, siendo todas terapias paliativas.

El tratamiento conservador de la incontinencia urinaria por excelencia es la rehabilitación del suelo pelviano, que implica todas las opciones terapéuticas desde ejercicios de Kegel, biofeedback, electroestimulación, etc. <sup>(22)</sup>

La base fundamental son, por tanto, los ejercicios de rehabilitación del suelo pelviano de Kegel que consisten en contracciones voluntarias intermitentes de la musculatura esfinteriana uretral. La frecuencia y la duración de la misma todavía no ha sido estandarizada, aunque existe un consenso general en que han de ser realizadas en múltiples ocasiones cada día y durante varios meses para obtener algún efecto.

Se han desarrollado diversos ensayos clínicos randomizados comparando el tratamiento rehabilitador con o sin biofeedback y asociados o no a estimulación del suelo pelviano, bien eléctrica o bien magnética. Varios de estos trabajos se han focalizado en el impacto en el corto plazo aunque también hay trabajos en el medio y largo plazo, es decir, sobre incontinencias ya establecidas. Puesto que la incontinencia urinaria tras prostatectomía radical mejora progresivamente durante al menos el primer año tras la cirugía, ningún tratamiento definitivo debe ser planteado con anterioridad. <sup>(7)</sup>

Los ejercicios de Kegel parecen ejercer un efecto beneficioso sobre el tiempo de recuperación de la incontinencia urinaria tras la cirugía del cáncer de próstata, siendo estos hallazgos estadísticamente significativos en los 3 y 6 primeros meses tras la intervención, pero no lo son tras los 12 meses de la misma. Ninguna de las medidas añadidas a los ejercicios de rehabilitación, como son el biofeedback y la estimulación del suelo pelvianos, han supuesto beneficios estadísticamente significativos sobre los ejercicios de Kegel. <sup>(22)</sup>

Se debe aconsejar a estos pacientes realizar los ejercicios de rehabilitación del suelo pelviano con la expectativa de acelerar la recuperación de la incontinencia durante ese primer año postoperatorio, y quizá mejorar la severidad de la incontinencia en el caso de no recuperarse.<sup>(23)</sup>

### **1.9.2.- Tratamiento quirúrgico:**

#### **1.9.2.1.- Tratamiento endoscópico (*Bulking agents*):**

El tratamiento endoscópico intrauretral mediante la inyección submucosa de diferentes agentes, biológicos o sintéticos, se lleva a cabo en el ámbito de la urología desde hace décadas. Esta modalidad terapéutica fue iniciada en la incontinencia femenina por Murless en 1938 mediante el empleo de una sustancia esclerosante (moorhuate sodium). En 1955 Quackels utilizó la parafina en dos pacientes y Sachse en 1963 empleó otra sustancia esclerosante, el Dondren. Ya en 1973 Berg y en 1974 Politano empezaron a emplear el Teflón. El principal mecanismo de acción de estos agentes es aumentar el contacto uretral a nivel del esfínter urinario incrementando de esta forma la resistencia al flujo urinario para conseguir así la continencia (*efecto Bulking o bulto que ocupa espacio*).<sup>(24,25)</sup>

Es considerado el tratamiento mínimamente invasivo por excelencia de la incontinencia urinaria. Por este motivo emergió como un tratamiento muy popular durante varias décadas. Como principal característica destaca su fácil implementación, lo que evita la necesidad de ser llevado a cabo por un urólogo con una elevada experiencia en este ámbito.

Se han empleado para este tratamiento diversas sustancias:

a) Agentes no autólogos:

El *colágeno bovino GAX* es un derivado acelular obtenido a partir de la dermis bovina y entrelazado con glutaraldehído para resistir el efecto de las colagenasas. Ha demostrado estabilidad y ausencia de migración, aunque tiene el riesgo de reacciones alérgicas hasta en el 4% por lo que hay que hacer test cutáneos previos.

b) Agentes autólogos:

Se ha empleado *grasa autóloga* pero ha presentado el inconveniente de perder volumen inyectado con el paso del tiempo, no poder inyectar grandes volúmenes por degradación de los adipocitos centrales y el riesgo constatado de embolismo pulmonar.

También se han empleado *condrocitos autólogos* con resultado variable.

c) Agentes artificiales:

c.1.) *Durasphere*: cuentas de circonio revestidas de carbón pirrolítico

c.2) *Urovive*: microesferas de poli-N- vinyl pirrolidona

c.3) *Teflón*: politetrafluoroetileno (PTFE)

c.4) *Macroplastique/Uroplasty*: microimplantes de silicona

c.5) *Deflux/Zuidex*: microesferas de ácido hialurónico y dextranómero: existe suficiente experiencia clínica en el tratamiento del reflujo vesicoureteral demostrando eficacia en el largo plazo

aunque no ha sido tan eficaz para el tratamiento de la incontinencia urinaria de esfuerzo femenina.

c.6) *Bioglas*: biocristal inyectable. Sólo usado en experimentos animales

c.7) *Coaptite*: hidroxilapatita cálcica

c.8) *Uryx*: copolímero de etilenvinilalcohol. No usado en incontinencia hasta la fecha.

c.9) *Prolastin*: polímeros proteicos constituidos por una mezcla de seda y elastina. Tan sólo se disponen de estudios preclínicos.

c.10) *Microesferas de ácido láctico-co-glicólico*: experiencia animal.

Hoy en día se siguen utilizando aunque de forma mucho más discreta, y siendo las sustancias más empleadas el copolímero de ácido hialurónico/dextranómero y el polidimetilsiloxano.<sup>(24)</sup>

En todas las series publicadas independientemente del material empleado, se describe una respuesta inicial destacable (60-80%) pero, en la mayoría de los casos, de duración inferior a tres meses, lo que obliga siempre a inyecciones repetidas a pesar de lo cual se han descrito efectos duraderos en el 15-20% de los casos con un número medio de inyecciones superior a 4.<sup>(25)</sup>

Como efectos secundarios se han descrito la migración al bazo, cerebro, pulmón, etc, sobre todo en el caso del Teflón, así como el hecho de que las inyecciones repetidas pueden dar lugar a lo que se conoce como una uretra congelada, rígida, con escasa elasticidad, lo que puede comprometer ulteriores tratamientos.<sup>(24,25)</sup>



Según las Guías Europeas de Urología, tan sólo pueden ser utilizados los “bulking agents” en pacientes altamente seleccionados con una incontinencia urinaria de esfuerzo post prostatectomía radical, con grado de recomendación C y un nivel de evidencia 3. (*www.uroweb.org*)

### **1.9.2.2.- Tratamiento mediante slings masculinos:**

Desde su introducción en la práctica clínica, los slings han focalizado su objetivo en el tratamiento de la incontinencia de esfuerzo masculina leve-moderada (1-3 compresas al día).<sup>(25)</sup>

Los slings para la incontinencia masculina fueron inicialmente descritos a principios del siglo XX. El primer sling descrito para este propósito utilizaba fascia del músculo recto anterior del abdomen y fue descrito en los años 40. Berry y Kaufman describieron las primeras evoluciones de los sling en 1961 y 1973 respectivamente, aunque las tasas de éxito y de complicaciones no permitieron su divulgación.<sup>(26)</sup>

La evolución con los años de los diseños descritos para el tratamiento de la incontinencia de esfuerzo masculina nos permite disponer a día de hoy de 4 grupos distintos de slings<sup>(26)</sup>:

#### **a) Slings anclados al hueso:**

Consisten en una malla orgánica o sintética que comprime la uretra bulbar al ser anclada a las ramas inferiores del pubis mediante 6 tornillos de titanio. La

degradación de las mallas orgánicas ha dado lugar a que sólo se disponga hoy en día de la versión con malla sintética (InVance;AMS). Se postula que su mecanismo de acción se basa en el aumento de la resistencia a la salida del flujo urinario.

b) Slings retrouretrales transobturadores:

La diferencia fundamental con los anteriores es que el sistema de anclaje se basa en unos brazos de malla de polipropileno que se ubican por vía transobturadora. Existen dos modelos en la actualidad, el AdVance (AMS) y el I-Stop TOMS (CL Medical). Su mecanismo de acción se basa en la hipótesis de que la incontinencia leve-moderada de estos pacientes se basa en el compromiso de las estructuras de soporte periuretral.

c) Slings retropúbicos ajustables:

En los slings retropúbicos ajustables la malla queda ubicada sobre la uretra bulbar proximal y por vía retropública hasta nivel de los músculos rectos anteriores, se deslizan los sistemas ajustables, bien suturas de prolene para el Reemex (Neomedic) o bien columnas de silicona corrugada con anillas ajustables. Se dispone de dos sistemas, el Reemex y el Argus (PromedonSA).

d) Sling “cuadrático”:

Este es el más recientemente introducido de todos, que consta de una malla que se ubica sobre la uretra bulbar que despliega 4 brazos para su anclaje, dos por vía transobturadora y dos por vía prepúbica. El mecanismo de acción del sling cuadrático y de los ajustables no es bien conocido, aunque probablemente se base en una combinación de compresión y angulación uretral.

En general, los mejores resultados obtenidos con los slings se dan en el grupo de pacientes con incontinencia de esfuerzo leve-moderada y sin radioterapia previa, con una recomendación de la guías europeas de urología grado C para un nivel de evidencia 3. Por otro lado, no existen recomendaciones específicas en relación a cada tipo de sling. ([www.uroweb.org](http://www.uroweb.org))

**1.9.2.3.- Sistema ProACT:**

Este sistema consta de dos balones de silicona que se colocan parauretralmente a nivel del cuello vesical en pacientes prostatectomizados, que se prolongan mediante unos tubos que finalizan en un puerto de titanio y que se localizan en el escroto. Su ventaja principal es permitir de forma ambulatoria el relleno de los balones de silicona aumentando la resistencia al flujo urinario hasta alcanzar la continencia.<sup>(24)</sup>

Las series publicadas reportan tasas de éxito de hasta el 67% aunque en la mayoría de los casos se requieren varios reajustes del volumen. El principal

inconveniente es la elevada tasa de complicaciones como son la erosión, la pérdida del volumen de los balones, la migración de los mismos y la infección, con una incidencia del 10-30% de los casos.<sup>(27)</sup>

En la actualidad, las guías europeas de urología no realizan una recomendación formal basada en la evidencia, por lo que su grado de recomendación es D con un nivel de evidencia 3. ([www.uroweb.org](http://www.uroweb.org))

#### **1.9.2.4.- Esfínter urinario artificial (AMS 800):**

El esfínter urinario artificial constituye a día de hoy el tratamiento de primera elección de la incontinencia urinaria masculina tras prostatectomía radical.

El sistema consta de tres componentes: reservorio presurizado, bomba y manguito uretral. Tanto el manguito uretral como el reservorio están disponibles en distintas medidas y presiones respectivamente, en función de la anatomía del paciente y el grado de incontinencia.

El primer esfínter urinario artificial fue descrito en 1972<sup>(28)</sup>. Desde entonces el sistema ha sufrido múltiples modificaciones y mejoras hasta el sistema disponible en la actualidad, el AMS 800 (*American Medical Systems*).

En las series publicadas a largo plazo, se describe una mejora de la continencia con el uso, como máximo, de una compresa al día en el 75-90% de los casos. Según las series, la tasa de revisión por fallo mecánico varía del 8 al 45%, siendo del 27% en la

serie más larga publicada hasta la fecha, y la tasa de revisión por causa no mecánica, como erosión, atrofia uretral e infecciones, varía del 7 al 17%. Sin embargo, la tasa de satisfacción subjetiva de los pacientes es del 85% al 95%. La expectativa de supervivencia del esfínter a 15 años es del 75%.<sup>(24,26,29,30)</sup>

Por todo esto sigue siendo el tratamiento de elección según las guías europeas de urología con un grado de recomendación B para un nivel de evidencia 2. ([www.uroweb.org](http://www.uroweb.org))

### **1.10.- Terapia celular:**

#### **1.10.1.- Recuerdo histórico:**

Se puede decir que la terapia celular se inició en el siglo XVII cuando R. Coger, médico de la corte de Luis XIV realizó las primeras transfusiones de sangre entre perros y J.B. Denis repitió, dos años después, los mismos procedimientos en París cogiendo sangre de corderos y transfundiéndola a humanos. No obstante no fue hasta 1919 cuando A. Pappenheim describió el concepto de célula troncal y 30 años después J. Hammond escribió un artículo en el cual se explicaba la metodología para mantener embriones de ratón en cultivos in Vitro. A pesar de estas importantes “pinceladas” se pueden considerar los trabajos de E.D. Thomas en 1957 como los pioneros de la Terapia Celular, los cuales acabaron con el primer trasplante de médula ósea y le valieron en 1990 el Premio Nobel de Fisiología y Medicina; estos trabajos han sido la primera evidencia demostrada de la existencia de células pluripotentes en el organismo de mamíferos adultos que han demostrado capacidad reparadora.<sup>(31,32)</sup>

En 1962 Gurdon descubrió en la Universidad de Cambridge tras experimentos realizados con ranas, que la especialización de las células maduras no tienen por qué quedar confinadas siempre a su estado especializado, siendo los primeros experimentos en clonación celular, lo que le valió el Premio Nobel de Medicina en el año 2012<sup>(31,32)</sup>.. Sus experimentos se basaron en la extracción del núcleo de un óvulo de rana sustituyéndolo por el núcleo de una célula intestinal, también de rana. Gurdon observó que a partir de éste óvulo se desarrolló un renacuajo completamente normal<sup>(33,34)</sup>. Sus experimentos fueron claves en la clonación del primer mamífero, la oveja Dolly, por I. Wilmut y otros mamíferos posteriormente

En 1964 Rodbell y cols. describen el proceso de aislamiento de células madre, siendo posteriormente perfeccionador por diferentes grupos de investigación. En 1981 Evans y Kaufman publicaron el cultivo de células madre embrionarias en ratón. . En 1983 J McGrath y D. Solter aislaron células embrionarias de ratón mediante microcirugía y realizaron la primera fusión nuclear utilizando virus como vehículo.

En 1976 Friedenstein describe en la médula ósea células estromales con capacidad clonogénica<sup>(35)</sup>. Posteriormente se describió una población de células con capacidad proliferativa y de diferenciación a varios linajes celulares. Estas células se denominaron células madre mesenquimales, mesenquimatosas o mesenquimáticas (MSC). Por su procedencia de la médula ósea también han sido denominadas células estromales. Friedenstein las describe como células con capacidad de adherirse al plástico, capaces de ser cultivadas durante tiempo indefinido sin modificar su fenotipo y que podían dar lugar a células óseas, cartílago, músculo, tendón, grasa y estroma medular. Posteriormente, en 1998 se logró el cultivo por parte de Thompson y cols., de

células madre de origen humano, demostrando que éstas eran capaces de dividirse de manera ilimitada, dando lugar a una producción que podía originar los diferentes tipos celulares somáticas del organismo, pudiendo por tanto emplearse en tejidos y órganos dañados, con efectos reparadores.

Las células madre mesenquimales derivadas el tejido adiposo fueron descritas por Gimble en el año 2000, quien describe la capacidad de diferenciación in vitro de éstas células a tejidos. Un año mas tarde el grupo liderado por el Dr. M. Hedrick describió una población multipotente a partir de la Fracción vasculostromal del tejido adiposo que es la que actualmente conocemos como *Adipose Derived Stem Cells* (ASC o ADSC: células troncales mesenquimales derivadas del tejido graso).<sup>(38,46)</sup>

A partir de este punto, los avances son vertiginosos con el descubrimiento de la reprogramación celular, más conocida como células iPS, células Pluripotentes inducidas, primero desde ratón y posteriormente humanas lo que ha valido en el año 2012 el Premio Nobel de Medicina a S. Yamanaka<sup>(36,37)</sup> junto con J. B. Gurdon por sus trabajos en anfibios expuestos anteriormente.

### **1.10.2- Células madre (*stem cell*):**

Entendemos por célula madre o célula troncal (según la última nomenclatura de la Agencia Europea de Terapias Avanzadas) aquella célula que posee las características de: autorreplicación, viabilidad a largo plazo y capacidad de diferenciación<sup>(38)</sup>. En las últimas décadas, se ha despertado un gran interés por la investigación en el campo de las células madre debido a su enorme potencial terapéutico. Esto es posible gracias a que se

dividen de forma simétrica y/o asimétrica, es decir, que cada célula madre origina dos células hijas, una de las cuales conserva su potencial de diferenciación y de autorrenovación, mientras que la otra se dirige hacia una estirpe celular determinada o ambas conservan su potencial de autorrenovación y diferenciación.

Hay diferentes tipos de células madre, que se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación a los diferentes linajes embrionarios o según la procedencia de las células.

En función de su origen las podemos clasificar en:

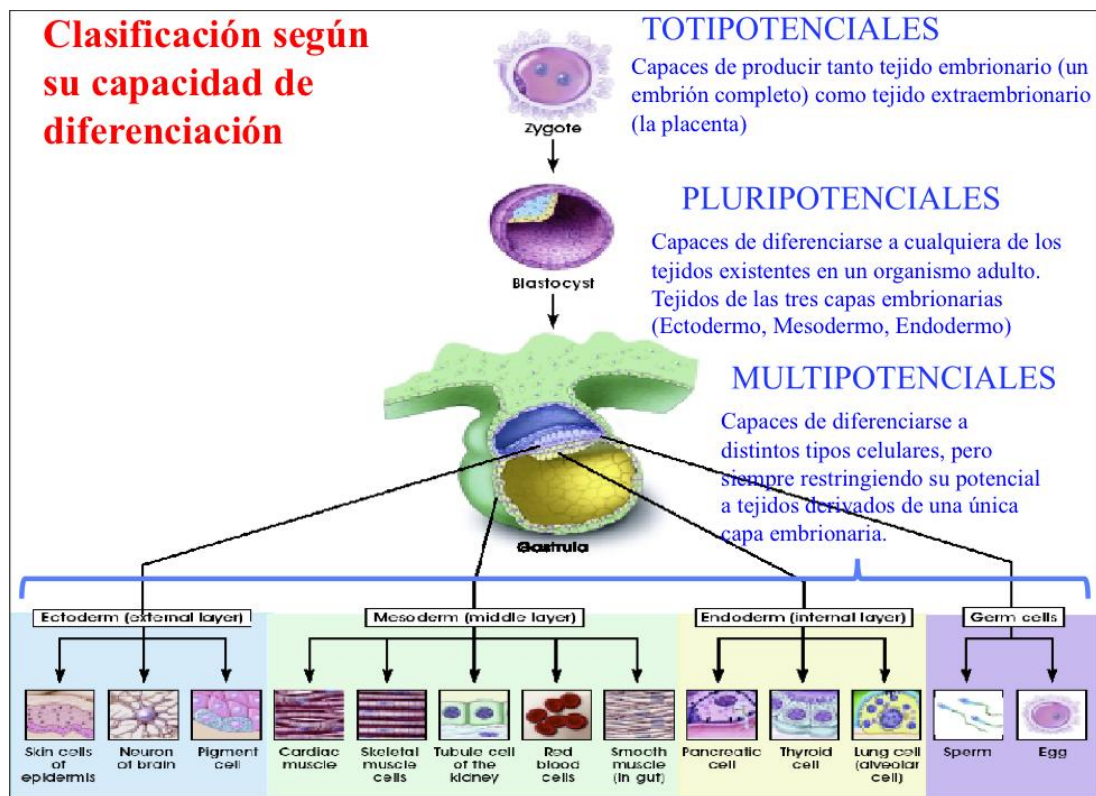
- Células madre embrionarias (ESCs).
- Células pluripotentes inducidas (iPS).
- Células madre adultas.

En función de su capacidad de diferenciarse a células procedentes de las distintas láminas se pueden clasificar en (Fig.1):

- Totipotenciales: tienen capacidad de diferenciarse a cualquier tipo de células tanto germinales como somáticas.
- Pluripotenciales: se diferencian a cualquier tejido somático.



- Multipotenciales : se diferencian a cualquier tejido derivado de su misma lámina embrionaria.



**Figura 1. Clasificación de las células madre según capacidad de diferenciación.**

#### **1.10.2.1.- Células madre embrionarias (ESCs):**

Solamente el cigoto u ovocito fertilizado y las células procedentes de sus primeras divisiones hasta el estado de mórula se consideran totipotentes, ya que pueden generar cualquier célula germinal o somática. A partir de los 4 días de desarrollo, estas células totipotentes comienzan a especializarse y forman el blastocisto. Las células de la

masa celular interna del blastocisto son pluripotentes porque a partir de ellas se desarrollan las tres hojas somáticas (ectodermo, mesodermo y endodermo) que darán lugar a los tejidos y órganos del embrión, pero no a un embrión completo, ya que son incapaces de formar la placenta y las células germinales<sup>(39)</sup>. Sin embargo, a pesar de la gran capacidad de reproducción y versatilidad de este tipo de células, las ESCs tienen una aplicación clínica limitada debido a los conflictos éticos derivados del uso de embriones humanos, a la posibilidad de rechazo inmunológico frente a las células trasplantadas<sup>(40)</sup> y lo más importante, por su elevado potencial teratogénico; cuando son implantadas *in vivo*, las ESCs generan masas tumorales benignas, constituidas por varios tejidos embrionarios, denominadas teratomas, que evolucionan con frecuencia hacia tumores malignos o teratocarcinomas<sup>(41)</sup>. No obstante, recientemente la FDA (Federal Drug Administration) norteamericana ha autorizado 2 ensayos clínicos con ESCs prediferenciadas *in vitro*, con el objetivo principal de conocer su seguridad y cuyos resultados aún no han sido comunicados.

#### **1.10.2.2.- Células pluripotentes inducidas (iPS):**

Las iPS se obtienen a partir de células somáticas, adultas y diferenciadas, que son reprogramadas genéticamente mediante la introducción de una serie de factores de transcripción, implicados en el mantenimiento del estado indiferenciado en las ESCs, es decir estaríamos hablando de una mezcla de Terapia Celular y Terapia Génica. En 2006, Takahashi y Yamanaka<sup>(37)</sup> (Nobel de Medicina 2012 por este descubrimiento) describieron por primera vez la reprogramación de fibroblastos de ratón, a los que se había introducido los genes Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc mediante vectores retrovirales. Los estudios de estos grupos demostraron que estos genes son los principales

responsables de la programación celular en el desarrollo eliminando el resto de combinaciones realizadas durante los estudios. Las iPS que obtuvieron presentaban la misma morfología, capacidad de proliferación y diferenciación, patrones de expresión génica, marcadores de superficie y potencial teratogénico que las células madre embrionarias procedentes de la masa interna del blastocisto, haciéndolas prácticamente indistinguibles. Un año más tarde, los mismos investigadores<sup>(42)</sup>, simultáneamente con el grupo de Thomson<sup>(41)</sup>, demostraron la posibilidad de reprogramar fibroblastos humanos. Aunque son numerosas las investigaciones en curso para conocer con mayor detalle el comportamiento de las iPS, actualmente existen demasiados obstáculos para su aplicación en clínica, dada la dificultad para controlar tanto el proceso de reprogramación celular como su capacidad teratogénica.

Sin embargo, estas células están constituyendo una herramienta muy valiosa para conocer el desarrollo celular y el desarrollo de modelos de enfermedades.

#### **1.10.2.3.- Células madre adultas:**

En los órganos adultos se ha descrito un pequeño número de células residentes encargadas de mantener las poblaciones celulares así como aumentar su proliferación en tejidos dañados, son las conocidas como células madre adultas. El uso de células madre en tejido adulto generan escasos problemas éticos, y aunque en un principio presentan un menor potencial que las células ESC, cada vez se conocen mejor y a gran parte de ellas se las está catalogando como multipotentes e incluso algunos autores hablan de pluripotentes; y así, estudios iniciales con células madre de médula ósea mostraron resultados esperanzadores en el campo de la medicina regenerativa.<sup>(44)</sup>

Se han hallado células madre de adulto en prácticamente todos los tejidos, destacando los estudios con células procedentes de músculo, médula ósea, tejido adiposo, folículos pilosos e incluso en la orina, que han sido empleadas en diversos estudios preclínicos. En la médula ósea, encontramos células madre de tres tipos diferentes: hemopoyéticas (HSC), endoteliales (EnSC) y mesenquimales (MSC). Las células madre hemopoyéticas tienen la capacidad de diferenciarse en varias líneas celulares de la sangre y pueden ser recolectadas mientras circulan por el torrente sanguíneo o mediante punción medular. Las células madre endoteliales tienen la capacidad de formar la línea celular del endotelio vascular, y las células mesenquimales la capacidad de diferenciarse en tipos celulares mesenquimales. Las MSC son fáciles de cultivar y tienen escasa expresión inmunogénica, y por tanto podrían emplearse de forma alogénica.

En los estudios realizados hasta la fecha se ha mostrado el tejido medular como el principal proveedor de células madre adultas. El tejido medular del adulto deriva del tejido mesodérmico embrionario y está compuesto por una población de células madre hematopoyéticas (HSC), las cuales se encargan de renovar todas las células hematopoyéticas del organismo adulto, en el seno del estroma mesenquimal de soporte. Dicho estroma, tanto en animales como en humanos, es muy heterogéneo y contiene gran variedad de poblaciones celulares; una de estas poblaciones la forman las llamadas células madres o troncales mesenquimales (MSC) que han demostrado tener capacidad para diferenciarse en estirpes derivadas de la hoja germinal de la que proceden, como adipocitos, fibroblastos, osteocitos, condrocitos y miocitos<sup>(45)</sup>, e incluso, bajo determinadas condiciones de cultivo “in vitro”, pueden dar lugar a células de linajes no

mesodérmicos, como neuronas, células endocrinas pancreáticas, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos.<sup>(46)</sup>

La médula ósea no es el único órgano que contiene este tipo de células estromales; se ha descrito que la mayoría de los tejidos adultos presentan una pequeña proporción de células troncales mesenquimales, generalmente de naturaleza multipotente. Se trata de reservorios de células “reparadoras”, que participan en la homeostasis tisular reemplazando a las células senescentes que se renuevan por mecanismos fisiológicos<sup>(47)</sup> y también podrían ser movilizadas e inducidas a diferenciarse en respuesta a señales liberadas en caso de lesión o estados patológicos<sup>(48)</sup>. Este tipo de células se han logrado identificar en una gran variedad de tejidos y órganos, como hueso trabecular, periostio, membrana sinovial, músculo, tejido adiposo, glándula mamaria, tracto digestivo, sistema nervioso central, pulmón, sangre periférica, dermis, folículo piloso, limbo corneal, etc.<sup>(47)</sup>

En la mayoría de los casos, las células madre de los tejidos adultos son capaces de diferenciarse en linajes celulares propios del nicho en el que se localizan, por ejemplo, las células madre del sistema nervioso central, que generan neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Incluso pueden existir células madre unipotentes, como las que se encuentran en la capa basal de la epidermis interfolicular (productoras de queratinocitos) o las células satélite que se encuentran en la lámina basal del tejido muscular y que son básicas en el proceso de reparación.

Estas células son poblaciones celulares con capacidad de autoregeneración que se encuentran distribuidas en nichos en distintos órganos y que conservan la plasticidad

para diferenciarse en tipos celulares de las distintas líneas germinales. A diferencia de las células embrionarias no tienen la tendencia a ser inmortales, por lo que tienen una capacidad limitada de diferenciación, y como consecuencia no tienen la tendencia a formar teratomas, y por tanto, son células más seguras.

### **1.10.3.- Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs):**

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs) se describieron por primera vez en 2001, definiéndolas como “células de lipoaspirado procesado” (“processed lipoaspirate cells” o PLA), debido a que se aislaron a partir de lipoaspirados humanos<sup>(46)</sup>. Entonces se presentaban como una población de células multipotentes procedentes de la fracción vasculoestromal (SVF) del tejido adiposo. Un año más tarde, los mismos investigadores demostraron su capacidad de diferenciación en células de diversos linajes<sup>(38)</sup>. A partir de ese momento, se empezó a hablar de las ASCs o ADSCs (por las siglas en inglés de “Adipose-derived Stem Cells”) como células madre mesenquimales presentes en el tejido adiposo adulto.<sup>(49)</sup>

Los criterios para demostrar que una célula podía considerarse células madre mesenquimal fueron definidos en el congreso de la IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics) celebrado en Toulouse en el año 2009, y ratificado por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) en el año 2013<sup>(50)</sup>, destacando:

1. Capacidad de adherencia al plástico con morfología fibroblástica

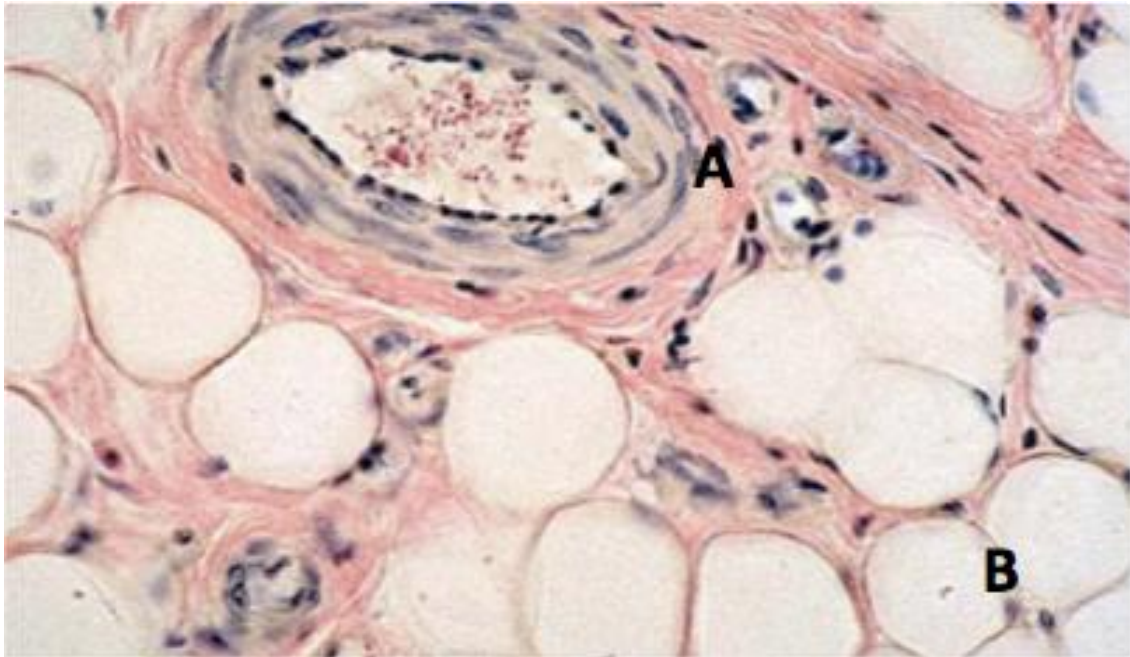
2. Expresión de al menos CD9, CD10, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 como marcadores de membrana; y ausencia de otros marcadores como CD14, CD34, CD45 y MHC II.
3. Capacidad de diferenciarse “in vitro” a adipocitos, osteocitos y condrocitos.

Los criterios que debería cumplir la fuente ideal de ASCs para uso médico fueron definidos por Gimble<sup>(51)</sup>:

1. Muy abundantes (millones o billones de células)
2. Poca morbilidad para la obtención
3. Capacidad para diferenciarse a múltiples líneas celulares de manera reproducible y regulada.
4. Capacidad de ser transplantada de forma autóloga y alogénica de forma segura para el organismo receptor.
5. Facilidad para manufacturación.

Teniendo en cuenta los criterios expuestos anteriormente, el tejido graso puede convertirse en un candidato idóneo. Debido a la tendencia a la obesidad en la sociedad moderna, la grasa es un tejido realmente abundante, cuya técnica de obtención es reproducible, con una morbilidad de la zona donante insignificante y una tasa de complicaciones, durante su extracción mediante liposucción, realmente baja. Además, pequeñas cantidades de tejido graso poseen gran cantidad de MSCs. Un gramo de grasa contiene aproximadamente  $5 \times 10^5$  MSCs, lo que supone una concentración de 500 veces mayor que en médula ósea. Por último, la ausencia de marcadores de histocompatibilidad de clase II en su membrana así como la baja capacidad de los

marcadores Tipo I, hacen de ellas unas células inmunoprivilegiadas que permiten utilizarlas tanto de forma autóloga como de forma alogénica, cumpliendo de esta manera todos los criterios definidos anteriormente.<sup>(51)</sup> (Fig.2)



**Figura 2. Estructura del tejido graso. (A) Fracción estromal. (B) Adipocitos. Hematoxilina-eosina x100.**

Estas células, al igual que las MSCs de médula ósea, presentan el potencial “in vitro” de diferenciación a diferentes tejidos mesodérmicos como tejido graso, óseo, condral y muscular y la capacidad de autorrenovación. También han demostrado que son capaces de secretar numerosas citoquinas y factores de crecimiento, con propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas e inmunomoduladoras, implicados en procesos de angiogénesis, cicatrización y reparación tisular.<sup>(52)</sup>

Aún falta mucho por conocer sobre las ASCs, pero se ha demostrado su capacidad de regular la función de las células T al promover la inducción de células T supresoras, e inhibir la producción de células T citotóxicas y células NK. Estos efectos,



complementados por la secreción de factores solubles como *interleuquina-10* (IL-10), *factor de crecimiento transformante beta* (TGF- $\beta$ ) y *prostaglandina E2*, justifican la capacidad inmunosupresora de estas células, como se ha puesto de manifiesto en un ensayo clínico para el tratamiento de la enfermedad de injerto frente a huésped (GVDH) mediante inyección intravenosa de ASCs<sup>(53)</sup>. Esta función inmunosupresora de las ASCs y su efecto adyuvante en la cicatrización se refleja también en los esperanzadores resultados que se están obteniendo en diversos ensayos clínicos, como el trasplante de ASCs para el tratamiento de fístulas en pacientes con enfermedad de Crohn<sup>(54)</sup> y de úlceras crónicas causadas por la radioterapia<sup>(55)</sup> y otros muchos, llegando actualmente a encontrarse más de 60 ensayos clínicos para diferentes patologías con estas células en el registro americano de ensayos clínicos (<http://clinicaltrials.gov>).

En lo referente al potencial para la reparación muscular de las ASCs, Zuk demostró en el 2004 la capacidad de diferenciación a miocitos “in vitro”. Esta misma autora ha confirmado que esta capacidad miogénica se encuentra claramente potenciada cuando se cultivan junto a mioblastos primarios. Este mismo estudio también realizó un experimento “in vivo” en un modelo de lesión muscular isquémica, encontrando células ASCs en el 20% de los miotúbulos en reparación, confirmando que las ASCs son capaces de participar en el proceso de reparación muscular si se encuentran en un “entorno miogénico” como puede ser el existente después de una rotura muscular<sup>(56)</sup>. Esta circunstancia ha sido confirmada por Bacou<sup>(57)</sup>, que ha encontrado una mejoría funcional y de tamaño en tejido muscular esquelético tratado con ASCs.

#### **1.10.4.- Bioseguridad de las ASC:**

Una de las principales limitaciones en el uso clínico de las MSC es el número insuficiente de células que se pueden aislar a partir de tejidos, y por lo que se requiere una fase de expansión ex vivo. Dado que la expansión ex-vivo de las MSC las convierten en una buena opción en un entorno clínico, es necesario prestar atención a la seguridad de las terapias celulares. Para lograr este objetivo se están desarrollando las condiciones de cultivo óptimas y protocolos de aislamiento consensuados. Además, se están realizando numerosos estudios de estabilidad genética para garantizar la calidad y seguridad de la producción de MSC para la práctica clínica.

Las ESC tienen tendencia a la inmortalidad y a la formación de teratomas, por lo que presentan problemas éticos y de seguridad oncológica para su aplicación clínica<sup>(58,59)</sup>. Del mismo modo, cuando planteamos la posibilidad de aplicar células madre adultas a seres humanos, la principal cuestión que debemos abordar es la posibilidad de desarrollar teratomas o cualquier proceso oncológico<sup>(60)</sup>. Tanto las ESC como las SC adultas, pueden dividirse de forma simétrica, bien para autorenovarse o para realizar una diferenciación terminal, o pueden dividirse de forma asimétrica, bien para generar una progenie diferenciada así como mantener un pool de células madre. Un equilibrio entre las señales de proliferación, supervivencia y diferenciación entre las células madre, células precursoras y células diferenciadas se mantienen a lo largo del desarrollo y de la vida adulta<sup>(61)</sup>. A diferencia de las ESC, las MSC de seres humanos adultos no tienden a ser inmortales y tienen una capacidad de diferenciación más limitada, por lo que no tienden a formar teratomas y por tanto, son más seguras<sup>(60)</sup>. Este proceso renovador no es perfecto, y las células hijas van

progresivamente perdiendo su capacidad de proliferación en parte como consecuencia de la erosión de los telómeros, cuya función principal es proteger a los cromosomas de la degradación, fusión y recombinación. Cuando los telómeros alcanzan un grado crítico de acortamiento se desencadena la muerte celular programada o apoptosis<sup>(62)</sup>. La proliferación celular influye en el cariotipo, de modo que algunos trabajos han puesto en duda la seguridad de los cultivos celulares de las MSC<sup>(63,64)</sup>, aunque posteriormente otros trabajos han evidenciado la seguridad de dichos cultivos a largo plazo<sup>(65,66)</sup>, inclusive tras implantes celulares de hasta 8 meses en ratones<sup>(67)</sup>. Se observa que las MSC cultivadas in vitro, por menos de aproximadamente unos 10 pases del cultivo, no supone ningún riesgo detectable de mutación celular o la formación de neoplasias. Los estudios en animales que utilizan MSC y/o ASC, tampoco presentan neoplasias asociadas a su uso, y los ensayos clínicos en seres humanos en fases tempranas completados hasta el momento apoyan la conclusión de que las MSC son seguras como agente terapéutico.<sup>(60, 68, 69- 71)</sup>

La seguridad no sólo comprende la seguridad oncológica, si no también los efectos de la distribución celular en el organismo una vez implantadas las células madre. Se han realizado estudios con diversas fuentes celulares (como las ASC) tanto tras la administración intravenosa como local, evidenciando la localización de las células a lo largo del tiempo en los distintos órganos. Los hallazgos más relevantes de estos trabajos son: la ausencia de distribución sistémica cuando se inyectan intramuscularmente en ratones, y la ausencia de desarrollo tumoral en ninguno de los tejidos cuando se inyectan vía intravenosa y migran a distintos órganos<sup>(68)</sup>. Nuestro grupo realizó estudios histológicos de pacientes sometidos a inyección de ASC para el tratamiento de fístulas

perianales tras 2 años del implante celular, sin evidenciar ningún hallazgo que sugiera ningún riesgo asociado con la terapia celular.<sup>(72)</sup>

Los estudios animales realizados con MSC y/o ASC reafirman la inexistencia de neoplasias asociadas a su uso, del mismo modo que los ensayos clínicos en seres humanos, la mayoría en fases aún tempranas, apoyan la conclusión de que las MSC son seguras como agente terapéutico, al menos con las dosis empleadas hasta la fecha. (*www.clinicaltrial.org*)

Por otro lado y amparándose en el inmuno-privilegio de estas células, se están desarrollando numerosos ensayos clínicos de seguridad para diferentes patologías utilizando células alogénicas; y al igual que ocurre con su uso autólogo, hasta la fecha no se ha descrito ningún acontecimiento adverso, lo cual parece confirmar el elevado perfil de seguridad que las MSC están demostrando, sea cual sea su origen.<sup>(73)</sup>

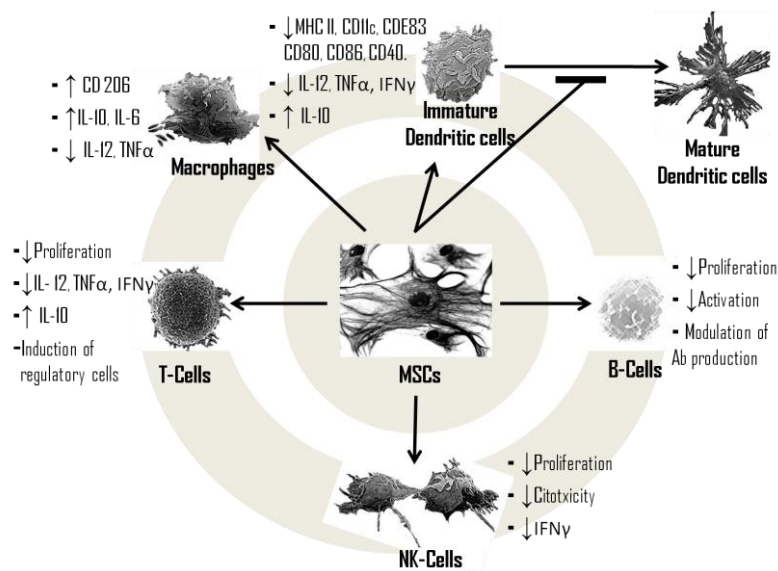
Analizando las diferentes posibilidades que nos presenta el estroma del organismo, para nuestro ensayo decidimos utilizar aquellas que, desde nuestro punto de vista, nos presentaban una gran facilidad de obtención, generando poca morbilidad y dolor para el paciente, y además eran fáciles de expandir hasta obtener la cantidad deseada. Las células elegidas son las células madre o troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo.

#### **1.10.5.- Mecanismo de acción:**

En cuanto al mecanismo de acción de las células madre existen dos líneas fundamentales de investigación. Por un lado, ha sido claramente probado la capacidad in vitro de las distintas células madre para diferenciarse en distintos tipos celulares (replicación asimétrica), y ha sido demostrado en distintos estudios animales su integración en el tejido huésped en el que han sido implantadas como los trabajos de Zhao y Obinata<sup>(74,75)</sup>. Se ha constatado la capacidad de diferenciación celular en distintos linajes de las MSC en general, y de las ASC en particular<sup>(45,46,48 y 50)</sup>, así como su capacidad de diferenciación muscular en distintos trabajos como los ya mencionados de Zuk<sup>(56,57,60)</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado en múltiples estudios la capacidad de éstas células de secretar distintos factores paracrinos, y que además difieren en función del tejido huésped. Se ha descrito la secreción de factores inmunomodulatorios, antiapoptóticos, angiogénicos, antifibróticos, y de crecimiento. Incluso en modelos animales se ha administrado las células por vía intravenosa y se ha demostrado como esas células se dirigen hacia el tejido dañado para secretar todos estos factores a nivel local.<sup>(60,73, 76, 77)</sup>

Por tanto, las células madre tienen dos vías de actuación fundamentales, por un lado tienen la capacidad de diferenciarse en un tipo celular dado y por tanto la teórica capacidad de regenerar un tejido dañado, y por otro tienen la capacidad de secretar diversos factores paracrinos que por sí mismos inician y promueven dicha regeneración tisular.<sup>(78)</sup> (Fig.3)



**Fig.3.- Mecanismo de Acción de las Células Madre**

#### **1.10.6.- Obtención y cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo:**

Las células madre estromales obtenidas a partir de tejido adiposo son muy similares a aquellas obtenidas a partir de médula ósea, con las ventajas que aporta dicho tejido frente a la médula ósea (mayor número de células, menor morbilidad). Se ha descrito la posible evolución de esta línea celular hacia líneas osteogénicas, miogénicas, condrogénicas e incluso células con características ectodérmicas. Estas células muestran características similares a las derivadas de médula ósea desde el punto de vista de marcadores de membrana (CD29, CD44, CD71, CD13, CD105, SH-3 Y STRO-1), poseyendo por otro lado, niveles algo diferentes de ciertos marcadores (CD49d, CD106 y CD54). Respecto a las características de adherencia estromal, crecimiento y capacidad de diferenciación, resulta muy similar a la de las células procedentes de médula ósea.<sup>(78,79)</sup>

Como es bien sabido, para que una estirpe celular sea aceptada para su uso

clínico debe cumplir las características ya descritas previamente<sup>(50)</sup>. Las ASC han demostrado cumplir estas características mejor que cualquier otra fuente celular.

Una vez obtenida la muestra de la liposucción, se realiza el lavado del tejido obtenido con solución salina tamponada (habitualmente un tampón salino fosfato), y posteriormente se separa el tejido adiposo mediante centrifugado de la muestra. El tejido aislado es digerido mediante la acción enzimática de la collagenasa (Tipo I o II según los autores) con el fin de obtener células individuales. Algunos autores utilizan otras enzimas (celasa, tripsina, etc.). A continuación, se inhibe el efecto de la enzima mediante la adición de medio de cultivo DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS). El siguiente paso consiste en un nuevo lavado con un tampón de lisis de eritrocitos (habitualmente cloruro amónico) durante 10 minutos para destruir los restos celulares hematopoyéticos, y los tejidos no disgregados resultantes se eliminan mediante filtrado por mallas de nylon de 700ym; por último, las células aisladas se lavan con tampón salino fosfato y se añaden a placas de cultivo. Pasadas 4-8 horas se procede a retirar las células que no se han adherido al plástico mediante una aspiración del medio de cultivo. Las células resultantes se van replicando hasta alcanzar una densidad próxima al 80% de confluencia. El medio de cultivo empleado habitualmente es el DMEM, al que se añade un 1% de antibiótico y entre un 10-20% de FBS (según los autores); existen otros medios de cultivo aprobados por las diferentes agencias reguladoras, aunque son grupos aislados los que los emplean ( por ej. suero de cabra o caballo, adición de factores de crecimiento, etc.). El aspecto de las células obtenidas al mirarlas al microscopio es fibroblástico, muy similar a los fibroblastos o a las células estromales de la médula ósea. Las células obtenidas pueden ser criopreservadas durante largos periodos de

tiempo, manteniendo la viabilidad y conservando sus propiedades biológicas. Dependiendo del cultivo y de los diferentes autores, se pueden obtener 3.000-5.000 células por cm<sup>2</sup>. Diferentes estudios describen la obtención de células homogéneamente positivas para CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD59, CD90 y HLA-ABC; y homogéneamente negativas para CD11b, CD45 y HLA-DR. El hecho de obtener una población tan homogénea procedente de múltiples donantes refuerza la idea del potencial empleo alogénico de este tipo de células en un futuro, especialmente por la ausencia de antígenos de histocompatibilidad clase II.<sup>(80)</sup>

Células madre de distintas fuentes han sido evaluadas como método terapéutico para la regeneración del esfínter urinario, y por tanto como tratamiento de la incontinencia. Uno de los aspectos que más han sido evaluados en los últimos años son los métodos de recolección, cultivo y expansión celular, además de análisis de bioseguridad, que nos permitan aplicar la terapia celular con las máximas garantías. Aún hoy en día, sigue siendo un aspecto importante de la terapia celular, y no completamente cerrado, que actualmente y en los próximos años dan y darán lugar a cambios legislativos a este respecto. No obstante, hasta la fecha todos los estudios realizados garantizan el proceso para su aplicación clínica.<sup>(81,82)</sup>

#### **1.10.7.- Incontinencia urinaria y ASC:**

La terapia celular ha sido y es protagonista de múltiples investigaciones preclínicas así como de ensayos clínicos. Sólo vamos a centrarnos en las publicaciones realizadas con célula madre derivada de la grasa y cuyo objeto principal de investigación haya sido la incontinencia urinaria.



Las ASC son células pluripotenciales con la capacidad de diferenciarse en células adiposas, células condrogénicas, miogénicas, osteogénicas y neurogénicas<sup>(84)</sup>. Desde el punto de vista de la incontinencia las ASC tienen especial interés para la regeneración mesodérmica y neuronal, y para promover la revascularización.

Se ha demostrado la capacidad de las ASC para diferenciarse en fibroblastos<sup>(85)</sup>, mioblastos<sup>(86)</sup>, célula muscular lisa<sup>(87)</sup>, célula endotelial<sup>(88)</sup> o músculo esquelético<sup>(57)</sup>. Del mismo modo se ha evidenciado su capacidad de expresión de marcadores específicos de músculo estriado, formar células multinucleadas características de los miotubos, y han demostrado la capacidad de regenerar la capacidad funcional del músculo estriado dañado.<sup>(57)</sup>

Igualmente las ASC expresan factores de crecimiento neurológicos en el momento de la diferenciación neural, que además presenta características gliales y promueve la regeneración nerviosa en modelo de rata.<sup>(89)</sup>

Todos estos hallazgos constituyen una sólida base para tratar la incontinencia urinaria mediante terapia celular regenerativa.

#### **1.10.7.1.- Estudios preclínicos:**

Son múltiples los experimentos animales realizados para estudiar la posibilidad de regeneración del esfínter urinario, y por ende la corrección de la incontinencia, utilizando células madre de diverso origen. Así, se han empleado células madre derivadas de la médula ósea, de líquido amniótico, de músculo y también derivadas de

la grasa. Igualmente, se han empleado en modelos animales células madre humanas derivadas del músculo, líquido amniótico y de sangre de cordón umbilical, con el mismo propósito<sup>(83)</sup>. Cabe destacar el trabajo de Jack y cols en el que emplearon en modelos animales con roedores ASC humanas, y demostraron la integración de las células en los estudios histológicos tras su administración periuretral.<sup>(90)</sup>

La mayoría de los estudios realizados con ASC han utilizado como modelo animal la rata salvo el primero que se realizó en el ratón. Todos tienen en común que han empleado alguno de los siguientes modelos de incontinencia: lesión esfinteriana, lesión neurológica mediante la lesión del nervio pudendo y la distensión vaginal que simula la lesión realizada durante el parto.<sup>(74,75,86,90-95)</sup>

El modelo más empleado ha sido el de la distensión vaginal. Este modelo tiene el inconveniente que no es válido más allá de la sexta semana dada la resolución espontánea de la lesión tras este periodo. Del mismo modo, la lesión neurológica tiende a la regeneración a partir de la segunda semana. Cabe destacar el trabajo de Zeng y cols<sup>(91)</sup> que demuestran la mejoría funcional del esfínter tras administración periuretral de ASC en un modelo de incontinencia permanente como es la uretrolisis.

En cualquier caso, en la mayoría de los trabajos publicados la vía de administración más frecuente ha sido la periuretral, salvo en el trabajo de Lin y cols. que emplearon tanto la vía intravenosa como la periuretral<sup>(92)</sup>. En este trabajo se evidencia tras la administración celular periuretral, que las ASC exhiben diferenciación in vivo a células musculares lisas y así aumentan la resistencia uretral al escape de orina.

En todos los estudios preclínicos se ha evaluado la respuesta funcional mediante la medición del LPP (leak point pressure), que mide la presión vesical máxima que produce una pérdida de orina. Son diversos los métodos descritos para realizar esta medición en el modelo animal, sin embargo, cabe destacar que en todos los trabajos se ha demostrado un aumento del LPP, y por tanto, una mejora funcional de la continencia tras la terapia celular.

Por otro lado, todos los trabajos salvo el de Fu y cols.<sup>(86)</sup> han realizado estudios histológicos que demuestran un aumento de la musculatura del esfínter lo que explicaría la mejoría funcional en el LPP. En la mayoría de los trabajos o bien no encuentran ASC o bien aparecen en cantidades muy escasas, lo que sugeriría que las células han realizado todo el recorrido de la diferenciación celular o que han perecido. Con respecto a los estudios histológicos, realizados siempre mediante tinciones con HE o tricómico de Masson, el aumento de la musculatura en la región inyectada se ha evidenciado en prácticamente todos los trabajos publicados, lo que evidencia el efecto regenerativo de la terapia celular.

En todos estos modelos animales se evidencia la supervivencia y la viabilidad de las células, así como la capacidad paracrina de las ASC en la región inyectada.<sup>(74,75, 83)</sup>

De entre todos los estudios preclínicos con células madre de diferente origen, sólo 5 han utilizado técnicas de inmunohistoquímica y de microscopía electrónica para demostrar la diferenciación celular. Destaca el trabajo de Lin y cols. que detectan escasas células ASC que expresan características musculares.<sup>(92)</sup>

Todos los estudios histológicos buscan demostrar la presencia de células madre en el tejido diana, y por tanto su correcta integración con el huésped. Esta integración permitiría a las células o bien diferenciarse en el tipo celular correspondiente o bien liberar los diferentes factores paracrinós, y así promover la regeneración tisular y funcional.<sup>(60, 70, 71)</sup>

Estudios preclínicos con ASC hasta la fecha por orden cronológico:

<b>AUTHOR</b>	<b>CELL SOURCE</b>	<b>SUI MODEL</b>
Jack y cols <sup>(88)</sup>	ASC	Ninguno: rata y ratón
Zeng y cols <sup>(89)</sup>	ASC	Uretrolisis: rata
Lin y cols <sup>(90)</sup>	ASC	Dilatación vaginal: rata
Fu Q y cols <sup>(84)</sup>	ASC (alogénica)	Dilatación vaginal: rata
Zhao W y cols <sup>(72)</sup>	ASC	Sección nervio pudendo: rata
Wu G y cols <sup>(91)</sup>	ASC (alogénica)	Sección nervio pudendo: rata
Watanabe y cols <sup>(92)</sup>	ASC (alogénica)	Sección nervio pudendo: rata
Obinata y cols <sup>(73)</sup>	ASC	Dilatación vaginal: rata
Li GY y cols <sup>(93)</sup>	ASC	Dilatación vaginal: rata

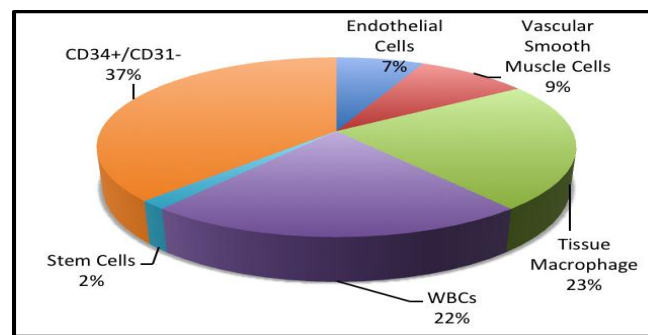
#### **1.10.7.2.- Estudios clínicos:**

Aunque los estudios preclínicos han demostrado una alentadora eficacia, son escasos los estudios clínicos publicados sobre el tratamiento de la incontinencia urinaria con células madre. Los trabajos más prometedores publicados hasta la fecha y con un mayor seguimiento son los realizados por el grupo de Strasser y Mitterberguer, en los que emplean células madre derivadas del músculo, que tanto en hombres como en mujeres aportaban resultados muy prometedores con tasas de éxito del 60-80% y seguimientos de hasta 2 años<sup>(96-98)</sup>. Sin embargo, diversos errores metodológicos pusieron en duda estos resultados<sup>(99)</sup>. No obstante, son varios los grupos que continuaron por esta senda de investigación publicando resultados igualmente esperanzadores.<sup>(100)</sup>

Con respecto a las células madre derivadas de la grasa (ASC), a pesar de que son múltiples los trabajos realizados en modelos animales, son escasas las publicaciones clínicas. Hasta la fecha tan sólo existe una publicación en pacientes a los que se les ha aplicado terapia con células madre derivadas de la grasa publicado en el 2012 por Yamamoto<sup>(101)</sup>. Sin embargo, este grupo realiza una técnica para evitar el proceso de expansión celular empleando la Fracción vasculo-estromal del tejido adiposo, la cual está compuesta por una suspensión celular diluyente cuyo contenido son células nucleadas y no nucleadas. Las no nucleadas son glóbulos rojos (RBC) que abarcan más del 22% del total de células suspendidas. Las nucleadas son aproximadamente el 80% del total de células suspendidas y de ellas sólo el 2% son ASC. Las nucleadas son viables en >70 %, presentan una concentración viable de  $>1,5 \times 10^5$  de células por gramo de grasa procesada y están presentes según los siguientes porcentajes:  $CD31^+/CD34^+$

( $>2\%$ );  $CD34^+/CD31^-/CD45^-$  ( $>10\%$ );  $CD45^+/CD31^-/CD34^-$  ( $>15\%$ ). La combinación de estos tres fenotipos constituyen más del 90% de las células nucleadas del producto (Fig.4).

**Fig. 4.- Porcentaje de los diferentes tipos celulares de la fracción vasculo-estromal**



Tan sólo aplicaron este tratamiento a tres pacientes, mejorando en todos ellos y corrigiendo completamente la incontinencia en un caso. Este grupo ha publicado recientemente sus resultados sobre 11 pacientes evidenciando una mejoría de casi el 60% en las pérdidas urinarias en 8 pacientes.<sup>(102)</sup>

También recientemente se ha publicado un estudio piloto en el que se tratan 5 mujeres con una combinación de ASC, colágeno bovino y solución salina en el que tras 1 año de seguimiento refieren una respuesta positiva en 3 pacientes.<sup>(103)</sup>

A diferencia de estos dos grupos, nosotros hemos realizado una selección de células madre derivadas de la grasa que hemos cultivado en medios adecuados para en

un segundo tiempo proceder al implante celular, por vía transuretral, *exclusivamente de células madre mesenquimales derivadas de la grasa (ASC)*.

## **2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO**



## **2.1.- Hipótesis:**

***Hipótesis principal:*** El uso autólogo de células madre derivadas del lipoaspirado (ASC) es factible y seguro para el tratamiento de la incontinencia urinaria tras cirugía radical del cáncer de próstata.

***Hipótesis Óptima:*** Se cumple la hipótesis principal y la eficacia, aunque no significativa, da valores superiores al 50% de éxito

Si se confirmaran las hipótesis principal y la hipótesis óptima usando ASC de forma autóloga sería pertinente plantear un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado y randomizado en Fase II, para analizar la eficacia del tratamiento con células madre frente al tratamiento tradicional.

## **2.2.- Objetivos:**

***Objetivo del proyecto:*** Realizar un Ensayo Clínico en fase I-IIa con control externo sobre una nueva aplicación de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, según las indicaciones desarrolladas en la Ley del Medicamento, para tratar una patología que altera considerablemente la calidad de vida de los pacientes que lo padecen.

***Objetivo principal:*** Evaluar la factibilidad y seguridad de las ASC autólogas para tratar la incontinencia urinaria tras cirugía radical del cáncer de próstata.

***Objetivo secundario:*** Obtener unos datos preliminales de la efectividad del tratamiento propuesto superior al 50% que permita diseñar en el futuro un Ensayo Clínico en Fase II frente a la misma patología.

***Objetivo terciario:*** Obtener datos sobre la mejora en la calidad de vida de los pacientes tratados mediante un test SF-36

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1.- Diseño del ensayo:**

Este ensayo ha sido registrado en el [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) con número NCT01799694 y financiado por el Ministerio de Sanidad español en la convocatoria del año 2009 (Expediente: TRA-009). Igualmente, ha sido aprobado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) y por el comité de ética (CEIC) del Hospital Universitario La Paz.

El objetivo principal de este ensayo es evaluar la factibilidad del proceso y la seguridad de la terapia celular, y como objetivo secundario obtener datos preliminares de la eficacia de la terapia celular para el tratamiento de la incontinencia urinaria tras prostatectomía radical así como los cambios en la calidad de vida de los pacientes. Para este propósito se programó seleccionar 10 pacientes para ser incluidos en este ensayo clínico. En todos los casos se debían incluir varones diagnosticados de cáncer de próstata y sometidos a tratamiento quirúrgico radical, al menos 18 meses antes de ser incluido en el ensayo, y que padecían una incontinencia urinaria tras haber fracasado al tratamiento conservador.

Todos los pacientes cumplían los criterios de inclusión y no cumplían ningún criterio de exclusión.

**Criterios de inclusión:**

- Firma del consentimiento informado.
- Varones mayores de 18 años, con buen estado general, de acuerdo con los datos de la historia clínica y la exploración física.
- Sujetos diagnosticados mediante biopsia de adenocarcinoma de próstata y sometidos a tratamiento quirúrgico radical con intención curativa al menos 18 meses antes.
- Presentar incontinencia urinaria tras su tratamiento quirúrgico.

**Criterios de exclusión:**

- Haber sido sometido a tratamiento adyuvante.
- Presentar un PSA  $\geq 0,2$  desde la cirugía.
- Presentar algún signo o síntoma que sugiera al investigador la no curación de su adenocarcinoma.
- Presentar obstrucción infravesical (se descartará mediante cistoscopia y flujometría).
- Infección de orina activa.
- Antecedentes de abuso de alcohol o de otras sustancias adictivas en los 6 meses anteriores a la inclusión.
- Presentar cualquier otra neoplasia maligna, salvo que se trate de carcinoma basocelular o epidermoide de la piel, o presentar antecedentes de tumores malignos, salvo que se hayan encontrado en fase de remisión durante los 5 años anteriores.
- Enfermedad cardiopulmonar que, en opinión del investigador, resulte inestable o revista la gravedad suficiente para descartar al paciente del estudio.
- Enfermedad médica o psiquiátrica de cualquier tipo que, en opinión del investigador, pueda suponer un motivo de exclusión del estudio.
- Sujetos con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, Hepatitis B y/o C, Tuberculosis o Treponema diagnosticados en el momento de la inclusión.
- Alergia del sujeto a los anestésicos.
- Cirugía mayor o traumatismo grave del sujeto en el semestre anterior.
- Administración de cualquier fármaco en investigación en el momento actual o tres meses antes del reclutamiento para este ensayo.

Todos los pacientes cumplían criterios de curación de su carcinoma prostático y manifestaban una clínica compatible con incontinencia urinaria de esfuerzo por déficit esfinteriano. Para certificar dichas características, todos los pacientes presentaban en sus revisiones rutinarias un PSA inferior a 0,2 ng/dl, y por tanto libre de recidiva bioquímica. Igualmente, en todos los casos se realizó un estudio urodinámico que confirmó el diagnóstico de incontinencia urinaria de esfuerzo por déficit esfinteriano. Del mismo modo, se realizó a todos los pacientes una uretrocistoscopia descartando alteraciones de la uretra y de la anastomosis vesicouretral, así como análisis de sangre completos y urocultivos que descartaron infección de orina activa o cualquier otro proceso intercurrente.

Durante el periodo de reclutamiento propuesto para el estudio (años 2011 y 2012) se reclutaron un total de 9 pacientes. En todos los casos el procedimiento de extracción celular consistió en una liposucción. La liposucción fue realizada por el Servicio de Cirugía Plástica del hospital mediante anestesia local y/o sedación en función del criterio del Servicio de Anestesia en cada caso. Se realizaron incisiones de 5 mm en ambos flancos del abdomen y se introdujo una aguja-cánula en el tejido subcutáneo. El proceso se repitió en ambos flancos para conservar la estética del paciente. La aguja fue conectada a una jeringa de 50 cc sobre la que se realizó el vacío y el tejido graso fue aspirado hasta obtener 100-150 cc de material tisular.

La muestra fue recogida y etiquetada por el biólogo de la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario La Paz, y trasladada al laboratorio productor para su procesamiento, cultivo y expansión. Tras un periodo medio de 4-6 semanas y una vez alcanzadas un máximo de  $40 \times 10^6$  de células se procedió al implante celular.

Según el diseño del ensayo existen 2 momentos para evaluar la respuesta clínica, a los 3 y a los 12 meses, pudiendo realizar una segunda inyección celular en función de dicha respuesta a los 3 meses. Por tanto, se obtuvieron de cada paciente 2 paquetes celulares, uno con  $20 \times 10^6$  de células para el primer implante y posterior evaluación al tercer mes (1<sup>er</sup> endpoint), y otro con  $40 \times 10^6$  de células que se criopreservaron en nitrógeno líquido hasta la decisión, al tercer mes de seguimiento, de su implante en función de la respuesta clínica.

El producto celular suministrado por el laboratorio productor (sala de producción celular de la Fundación para la Investigación del Hospital Gregorio Marañón) cumplió con todos los requerimientos legales, y previamente a su liberación fue caracterizado y analizado tanto fenotípica como genotípicamente (incluyendo cariotipado celular); además de descartarse contaminaciones bacterianas, fúngicas o virales y alteraciones de las células obtenidas.

El implante celular se realizó bajo sedación y en posición de litotomía. En todos los casos se utilizó un cistoscopio compacto 17 Ch y una aguja endoscópica 7 Ch para la inyección celular bajo visión directa en la zona próxima al cuello vesical y a lo largo del esfínter externo. Se procedió a una distribución aleatoria del material celular mediante la inyección de volúmenes de 0,2-0,3 ml del vial con ASC, realizando en todos los casos 7-8 inyecciones para un volumen total de unos 2 ml.

Como evaluación clínica, a todos los pacientes se les ha realizado una exploración física completa, fueron sometidos a una analítica completa de sangre, una serología para VHB, VHC, VIH, y sífilis, así como un test de Mantoux y un urocultivo.

Igualmente todos los pacientes respondieron a cuestionarios de calidad de vida (SF-36) y de incontinencia urinaria (ICIQ-SF).

Todos los pacientes han sido evaluados por el especialista en Cirugía Plástica y por el Servicio de Anestesia previa inclusión en el ensayo.

Se trata fundamentalmente de un estudio de seguridad y factibilidad. Para ello, hemos procedido a realizar una evaluación basal y tras el implante celular, hemos realizado visitas control a la semana, 1, 3, 6, 9 y 12 meses postimplante. En todas las visitas de seguimiento hemos realizado una anamnesis, exploración física, analítica de sangre completa, un urocultivo y una flujometría para diagnosticar cualquier efecto deletéreo del tratamiento con células madre, tanto a nivel local como sistémico. Además, y para valorar el efecto de la terapia celular sobre la incontinencia, hemos recogido el número de absorbentes diarios utilizados por el paciente, hemos realizado un test de la compresa de 24 horas y hemos pasado cuestionarios de calidad de vida y de incontinencia en la visita basal, y en todas y cada una de las visitas control. (Tabla 1)



**Tabla 1: Cuadro de tareas en cada visita**

<b>VISITA</b>	<b>Pr</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+2</b>	<b>+3</b>	<b>+4</b>	<b>+5</b>	<b>+6</b>
<b>Firma de CI</b>		x								
<b>Documentación</b>	x									
<b>Criterios de selección</b>		x								
<b>Historia médica</b>		x								
<b>Cuestionario SF-36</b>		x			x	x	x	x	x	x
<b>Cuestionario ICQSF</b>		x			x	x	x	x	x	x
<b>Solicitud de analítica</b>		x			x		x	x	x	
<b>Analítica (sangre y orina)</b>			x			x		x	x	x
<b>Solicitud Estudio urodinámico</b>		x							x	
<b>Estudio urodinámico</b>			x							x
<b>Test de la Compresa</b>		x				x	x	x	x	x
<b>Solicitud Flujiometría</b>				x	x	x	x	x	x	
<b>Flujiometría</b>						x	x	x	x	x
<b>Solicitud uretrocistoscopia</b>	x								x	
<b>Uretrocistoscopia</b>		x								x
<b>Liposucción o biopsia</b>			x							
<b>Intervención (implante celular)</b>				x						
<b>End Point I</b>							x			
<b>End Point II</b>										x
<b>Control Medicación</b>		x		x	x	x	x	x	x	x
<b>Evaluación de efectos adversos</b>					x	x	x	x	x	x

Como valoración de la resolución de la incontinencia hemos definido una primera evaluación a los tres meses del implante y una segunda evaluación a los 12 meses. En estos dos momentos, además de las ya mencionadas evaluaciones se procedió a realizar una uretrocistoscopia, para descartar alteraciones en la uretra y anastomosis vesicouretral tras el implante, y un estudio urodinámico, para evaluar la incontinencia urinaria tras el implante celular, siendo ambas exploraciones opcionales en el tercer mes, a consideración del investigador. Además, todos los resultados clínicos del ensayo han sido evaluados al final del seguimiento por un investigador independiente para confirmar los datos y las conclusiones del equipo investigador.

La **factibilidad del proceso** se ha definido como la ausencia de problemas y de efectos adversos severos durante la obtención de la muestra así como durante el implante celular.

La **seguridad de la terapia** ha sido definida como la ausencia de efectos adversos tanto a nivel local como sistémicos relacionados con el implante celular.

La **respuesta clínica** ha sido definida como una mejoría objetiva en las pérdidas urinarias medidas mediante el test de la compresa superiores al 50%.

### **3.2.- Análisis estadístico:**

Los datos se procesaron informáticamente mediante una base de datos en formato Microsoft Excel, que más tarde fue importada para su tratamiento estadístico en

el programa SPSS versión 11.5. Se consideran diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentan una probabilidad de error menor del 5% ( $p < 0.05$ ).

Para la descripción de variables cuantitativas continuas se utilizó la media junto con la desviación estándar. Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y frecuencias relativas expresadas en porcentaje. Cuando se consideró conveniente, el análisis descriptivo de variables cuantitativas se representó de forma gráfica como líneas de tendencia.

Las comparaciones entre variables cuantitativas se realizó principalmente mediante el estudio de la evolución temporal. Se realizó un estudio pareado antes-después, mediante el test no-paramétrico de Wilcoxon (Wilcoxon's Signed Rank Test).

### **3.3.- Análisis de seguridad:**

La incidencia de efectos adversos y efectos adversos severos e inesperados han sido analizados tras el implante de  $20 \times 10^6$  ASC y tras  $40 \times 10^6$  ASC en cada visita de seguimiento: implante, visita 1 semana, visita 4 semanas, visita a los 3, 6, 9 y 12 meses.

Se ha incorporado esta evaluación intermedia a los 3 meses por un doble motivo. En primer lugar, porque es conocido el beneficio inicial de la terapia endoscópica para la incontinencia durante el primer mes, efecto bulking, y se ha estimado que pasados 3 meses del implante celular el posible beneficio pasaría a ser efecto directo de la terapia celular. En segundo lugar, porque se ha hecho una valoración inicial de seguridad así como de la dosis necesaria para un efecto clínico; para ello se ha realizado una primera

inyección con tan sólo  $20 \times 10^6$  de células para evaluar a los 3 meses, y decidir en función de la respuesta clínica continuar con el seguimiento hasta los 12 meses o proceder a una segunda inyección de  $40 \times 10^6$  de células iniciando un nuevo seguimiento hasta completar los 12 meses (en estos casos se realiza un seguimiento total de hasta 15 meses).

#### **4.- RESULTADOS**

#### **4.1.- Reclutamiento - extracción celular:**

En todos los casos se ha podido realizar la liposucción sin ninguna dificultad con un tiempo quirúrgico medio de 30 minutos. De forma variable todos los pacientes presentaron equimosis y dolor a punta de dedo en las crestas iliacas de hasta 1 mes de duración pero de escasa relevancia. En el cuarto paciente, tras realizar la liposucción la muestra para cultivo celular se contaminó con una infección fúngica que invalidó la muestra, evidenciado en análisis previos a la liberación del lote por el laboratorio productor. Se comprobó que era una infección propia de la piel del paciente, por lo que decidimos repetir la liposucción y finalmente incluirlo en el ensayo, aunque esto impidió reclutar un total de 10 pacientes, por consumir los recursos de dos liposucciones y su cultivo celular con un único paciente. Por otro lado, el caso 6 tras realizar la liposucción y durante el proceso de cultivo celular (previo al implante), fue diagnosticado de una neoplasia pancreática, por lo que al no cumplir los criterios de inclusión fue excluido del ensayo. Por todo ello, finalmente reclutamos 9 pacientes, y se realizó el implante celular a un total de 8 pacientes.

#### **4.2.- Terapia celular:**

En todos los casos se ha podido realizar la inyección endoscópica sin dificultad y sin ningún tipo de incidencia, con una duración media de procedimiento de 20 minutos. Todos los pacientes manifestaron cierta disuria de duración variable de 1 a 3 días.

Desde un punto de vista sistémico, la terapia celular no ha supuesto ningún efecto adverso importante para ningún paciente, ni desde un punto de vista clínico ni

analítico. En ninguno de los pacientes se ha desarrollado recidiva bioquímica tras las múltiples analíticas realizadas en cada visita durante los 12-15 meses de seguimiento.

Desde un punto de vista local, ningún paciente ha manifestado alteración alguna en la clínica miccional, confirmado con las flujometrías realizadas en cada visita así como en las uretrocistoscopias en la evaluación final. (Tabla 2)

**TABLA 2: EVALUACIÓN MICCIONAL**

	<b>FLUJOMETRÍA BASAL (ml/sg)</b>	<b>FLUJOMETRÍA FINAL (ml/sg)</b>	<b>URODINAMIA BASAL</b>	<b>URODINAMIA FINAL</b>
<b>CASO1</b>	15	21,5	IUE	IUE
<b>CASO 2</b>	46,3	20,7	IUE	<b>NO IUE</b>
<b>CASO 3</b>	69	17	IUE	IUE
<b>CASO 4</b>	10	74,8	IUE	IUE
<b>CASO 5</b>	28	15	IUE	<b>MEJORÍA</b> IUE
<b>CASO 6</b> <i>(excluido)</i>			IUE	
<b>CASO 7</b>	20	30,6	IUE	IUE
<b>CASO 8</b>	14	22	IUE	<b>NO IUE</b>
<b>CASO 9</b>	27	37,2	IUE	IUE

De los 8 pacientes sometidos a terapia con células madre derivadas de la grasa, 2 sólo recibieron una primera inyección de 20 millones de células y los otros 6 recibieron una primera inyección de 20 millones de células, y a los 3 meses una segunda inyección de 40 millones de células.

El 25% (2/8) de los pacientes, casos nº 5 y nº 9, reflejaron una mejoría clínica subjetiva y objetiva superior al 50% a los 3 meses del seguimiento tras ser tratados con  $20 \times 10^6$  ASC. El caso nº 9, tras 6 meses de seguimiento, empeoró hasta volver a su situación basal al mes 9 de seguimiento. El caso nº 5 conservó la mejoría tras 12 meses de seguimiento, pasando de unas pérdidas de orina de 16 gr. preimplante a 3 gr. al finalizar el seguimiento, llegando a estar por temporadas sin el empleo de ninguna compresa. (Tabla 3)

El 33,3% (2/6) de los otros 6 pacientes que fueron sometidos a una segunda inyección de ASC, casos nº2 y nº8, reflejaron una mejoría clínica subjetiva y objetiva superior al 50% que se ha mantenido tras los 12 meses de seguimiento. El caso nº 2 pasó de unas pérdidas de 41 gr. preimplante a 9 gr. al finalizar el seguimiento, mientras que el caso nº 8 pasó de 287 gr. preimplante a 123 gr. al finalizar el seguimiento. (Tabla 3) (Fig.5)

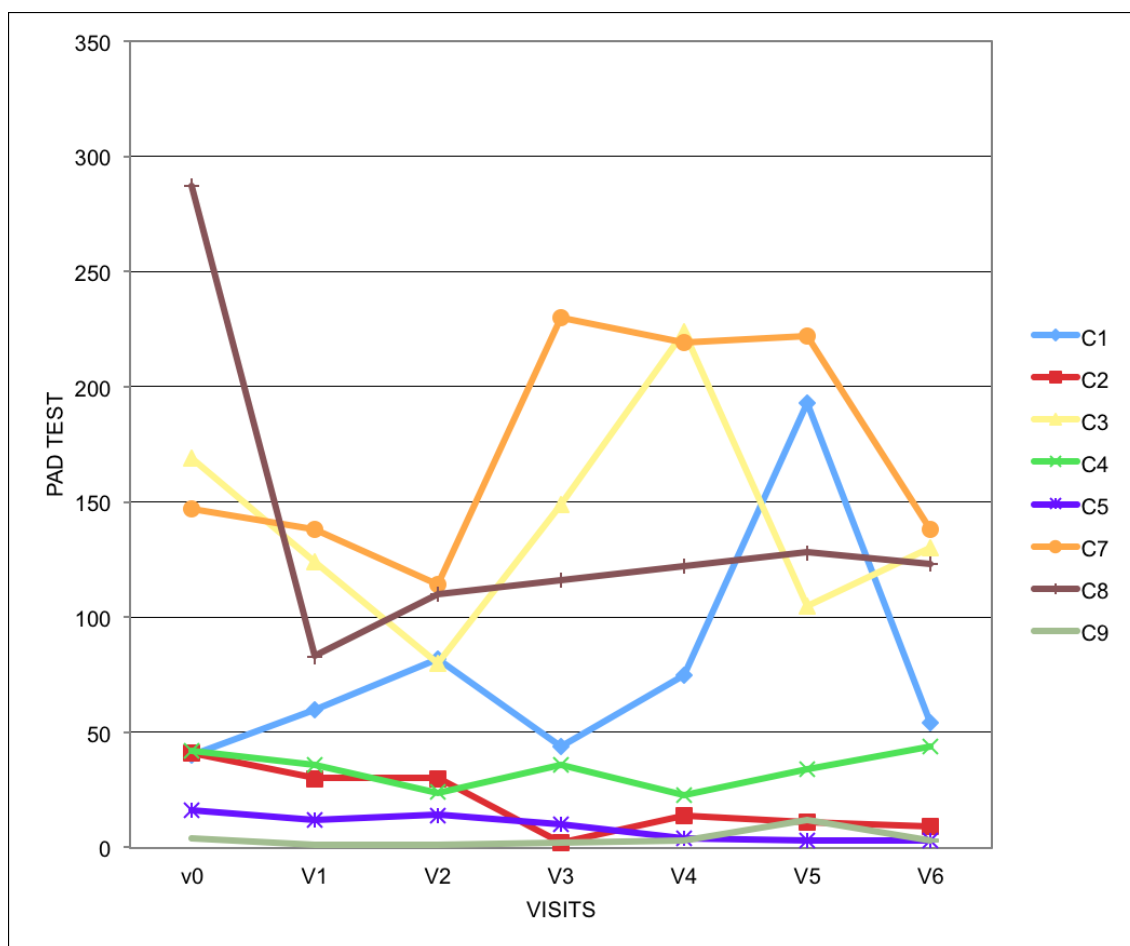


**TABLA 3: CUANTIFICACIÓN INCONTINENCIA URINARIA**

<b>CASO</b> <i>(p&lt;0,05)</i>	<b>PAD TEST 0</b>	<b>PAD TEST 1</b>	<b>PAD TEST 2</b>	<b>PAD TEST 3</b>	<b>PAD TEST 4</b>	<b>PAD TEST 5</b>	<b>PAD TEST 6</b>	<b>Nº CP/DIA 0</b>	<b>Nº CP/DIA 6</b>
<b>20 MILL ASC</b>									
<b>1</b>	40			44					
<b>2</b>	41	30	20	24					
<b>3</b>	169	55	101	76					
<b>4</b>	42	32	19	31					
<b>5</b>	16	12	14	10	4	3	3	1	0-1
<b>6</b>									
<b>7</b>	147	197	178	100					
<b>8</b>	287	295	246	218					
<b>9</b>	4	1	1	2	3	12	3	1	1
<b>40 MILL ASC</b>									
<b>1</b>	40		82	44	75	193	54	2	2
<b>2</b>	41	30	30	2	14	11	9	1	1
<b>3</b>	169		80	149	224	105	130	1	2
<b>4</b>	42	36	24	36	23	34	44	2	2
<b>5</b>									
<b>6</b>									
<b>7</b>	147	138	114	230	219	222	138	3	3
<b>8</b>	287	83	110			128	123	2	1
<b>9</b>									

**FIG.5.- EVOLUCION DEL PAD TEST DESDE VISITA PREIMPLANTE**

**(V0) HASTA VISITA FINAL (V6):**



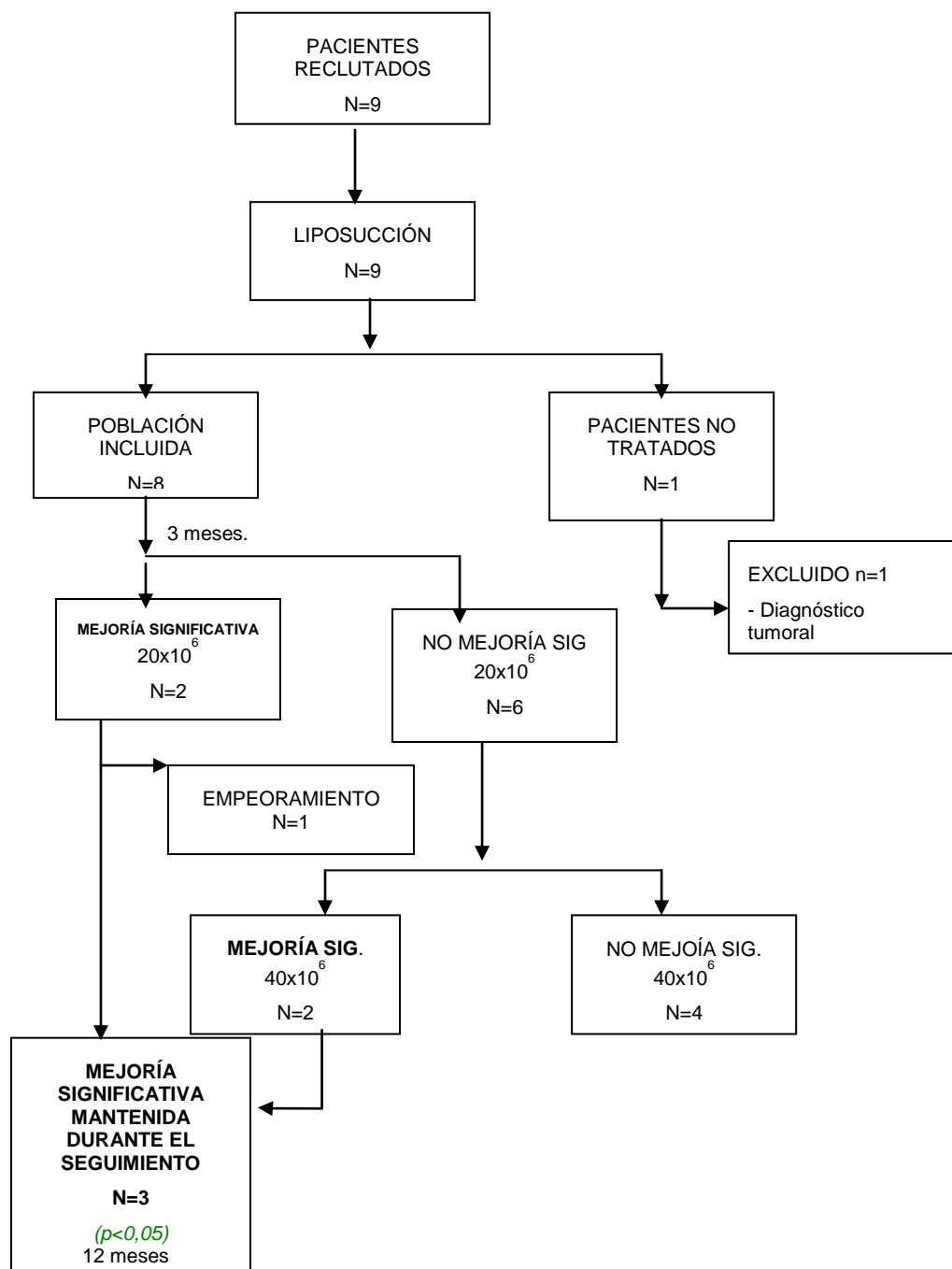
Desde el punto de vista del estudio urodinámico no se ha evidenciado ninguna alteración comparando el estudio basal con el de evaluación final. Desde un punto de vista de eficacia clínica los casos 2 y 8 no han evidenciado incontinencia urinaria en el estudio final, mientras que el caso 5 es descrito como mejoría respecto al basal. (Tabla 4)

**Tabla 4.- Eficacia clínica: correlación Pad Test – Urodinamia**

<b>CASO</b> <i>(p&lt;0,05)</i>	<b>PAD TEST 0</b>	<b>PAD TEST 1</b>	<b>PAD TEST 2</b>	<b>PAD TEST 3</b>	<b>PAD TEST 4</b>	<b>PAD TEST 5</b>	<b>PAD TEST 6</b>	<b>URODIN AMIA BASAL</b>	<b>URODIN AMIA FINAL</b>
<b>20 MILL ASC</b>									
<b>1</b>	40			44				IUE	IUE
<b>2</b>	41	30	20	24				IUE	IUE
<b>3</b>	169	55	101	76				IUE	IUE
<b>4</b>	42	32	19	31				IUE	IUE
<b>5</b>	16	12	14	10	4	3	3	IUE	IUE- MEJORÍA
<b>6</b>								IUE	IUE
<b>7</b>	147	197	178	100				IUE	IUE
<b>8</b>	287	295	246	218				IUE	IUE
<b>9</b>	4	1	1	2	3	12	3	IUE	IUE
<b>40 MILL ASC</b>									
<b>1</b>	40		82	44	75	193	54	IUE	IUE
<b>2</b>	41	30	30	2	14	11	9	IUE	NO IUE
<b>3</b>	169		80	149	224	105	130	IUE	IUE
<b>4</b>	42	36	24	36	23	34	44	IUE	IUE
<b>5</b>									
<b>6</b>									
<b>7</b>	147	138	114	230	219	222	138	IUE	IUE
<b>8</b>	287	83	110			128	123	IUE	NO IUE
<b>9</b>									

De forma global, 3 pacientes (casos 2, 5 y 8) presentaron una mejoría clínica subjetiva y objetiva superior al 50% con diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) y mantenida en el tiempo durante más de 12 meses, lo que arroja una tasa de éxito según los criterios del ensayo del 37,5% (3/8). (Fig. 6)

**FIG. 6.- FLOWCHART:**



#### **4.3.- Calidad de vida:**

Hemos utilizado los cuestionarios SF-36 y ICIQ-SF para el análisis del impacto de la incontinencia urinaria en la calidad de vida y no se ha podido evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre la situación basal y el final del seguimiento, así como durante el seguimiento en cada visita.

#### **4.4.- Efectos Adversos:**

No se ha evidenciado ningún efecto adverso relacionado con la terapia celular a los 3 meses de seguimiento tras el implante de  $20 \times 10^6$  ASC en ninguno de los 8 pacientes tratados en relación a todas las variables recogidas en el ensayo. (Tabla 1)

No se ha evidenciado ningún efecto adverso relacionado con la terapia celular a los 3 meses de seguimiento tras el implante de  $40 \times 10^6$  ASC en ninguno de los 6 pacientes tratados en relación a todas las variables recogidas en el ensayo. (Tabla 1)

No se ha evidenciado ningún efecto adverso tras los 12-15 meses de seguimiento según el protocolo del ensayo en ninguno de los 8 pacientes incluidos en el ensayo. Tampoco se han descrito efectos adversos en los meses siguientes a la conclusión del ensayo en el contexto del seguimiento por el cáncer de próstata.

## **5.- DISCUSION:**

La primera cuestión a analizar es si es pertinente plantear tratamientos alternativos a los disponibles para el tratamiento de la incontinencia urinaria masculina. El tratamiento de referencia para la incontinencia urinaria masculina postquirúrgica es el implante de un esfínter urinario artificial, y siendo de primera elección el esfínter AMS800. Se trata de un procedimiento quirúrgico que implica una anestesia al menos regional, al menos una incisión perineal, un tiempo quirúrgico que puede oscilar entre 1-2 horas según las series, y una estancia hospitalaria de 2-3 días. La tasa de éxito de este procedimiento es al menos del 80% y la tasa de complicaciones es inferior al 10%. Por otro lado las tasas de satisfacción de los pacientes publicadas rondan el 75-95%. Sin embargo, no es un procedimiento exento de morbilidad y complicaciones en el corto, medio y largo plazo.<sup>(24,26,28,30)</sup>

Si el resultado de este procedimiento fuera plenamente satisfactorio, no se hubieran desarrollado procedimientos alternativos en el pasado ni lo harían en la actualidad. El tratamiento ideal de cualquier patología, incluida la incontinencia urinaria, es aquel procedimiento exento de complicaciones, nada o mínimamente invasivo, con una tasa de éxito del 100%, duradero a lo largo de la vida del paciente y desde luego coste efectivo. Lógicamente, este procedimiento no existe, pero cualquier alternativa desarrollada en la actualidad quiere acercarse a este ideal. Con este propósito se desarrollaron en el pasado múltiples procedimientos endoscópicos que ofrecían menor agresividad quirúrgica pero que desgraciadamente no cumplieron ni con el objetivo de la ausencia de complicaciones ni con una mejor tasa de éxito; de hecho, las escasas tasas de curación y su corta duración han llevado al práctico abandono de estos procedimientos<sup>(24-26)</sup>. Otros procedimientos también expuestos en esta tesis, tales como los sling han intentado competir por ofrecer un procedimiento más económico, pero no

han demostrado superioridad ni en términos de agresividad ni tampoco en términos de eficacia. Sin embargo, ofrecen tasas de éxito aceptables por lo que han encontrado su espacio como indicación en las incontinencias leves-moderadas.<sup>(25,26)</sup>

Por tanto, el procedimiento ideal para el tratamiento de la incontinencia urinaria no ha sido hallado por el momento, por lo que es pertinente explorar nuevas alternativas con el fin de mejorar los tratamientos disponibles hasta la fecha. Desde un punto de vista general, la terapia celular ofrece la posibilidad de regenerar el tejido y/o órgano dañado sin la necesidad de utilizar ningún dispositivo artificial, y mediante procedimientos mínimamente invasivos. El hecho de no necesitar materiales sintéticos ofrecería una teórica ventaja desde el punto de vista de la durabilidad del tratamiento y la ausencia de complicaciones relacionadas con dispositivos inorgánicos en el corto, medio y largo plazo. Por otro lado, al tratarse de células obtenidas del propio paciente no hay riesgo de rechazo, lo que supone una ventaja añadida. Desde un punto de vista económico, la terapia celular hoy en día es cara, sin embargo, y en el corto recorrido que tiene en sus aplicaciones clínicas hemos vivido una normalización de costes más que considerable, lo que la convierte en una terapia competitiva en relación a las terapias actuales. Además, conforme su utilidad se amplíe los costes serán previsiblemente reducidos.

Desde el punto de vista de la agresividad, cabe destacar que tanto el procedimiento de extracción como el del implante celular se realizan con sedación y en régimen ambulatorio o de corta estancia. Los riesgos inherentes tanto a la liposucción como a la inyección endoscópica de células en la región esfinteriana son prácticamente inexistentes. Además, conviene resaltar que previamente a nuestros resultados, los



estudios en modelos animales avalan la seguridad de la terapia celular administrada de forma local<sup>(68)</sup>. Esta circunstancia supone una ventaja indiscutible de la terapia celular sobre los tratamientos habituales. Ambos procedimientos ofrecen un riesgo anestésico mínimo.

La liposucción es un procedimiento quirúrgico con un riesgo mínimo de complicaciones puesto que tan sólo se requieren 100-150 gramos de grasa para nuestros propósitos, por lo que la superficie utilizada para su extracción y en consecuencia el tiempo quirúrgico son limitados. Tras la liposucción los pacientes pueden presentar equimosis durante aproximadamente 1 mes, y ocasionalmente referir dolor a punta de dedo en las crestas ilíacas de intensidad y duración variable. Tras el implante celular, los pacientes refieren cierta disuria por un periodo de duración de entre 1 y 3 días, y en nuestra experiencia ninguna otra sintomatología.

En todos los pacientes ha sido posible realizar tanto la liposucción como el implante celular tal y como había sido programado a la inclusión de los pacientes en el ensayo clínico. Aún más, numerosos estudios clínicos están analizando la posibilidad de aprovechar la capacidad inmunogénica de las células troncales mesenquimales, ya que carecen de antígeno de histocompatibilidad tipo II y el I es casi inexistente, y utilizar células alogénicas, lo cual evitaría realizar la liposucción a los pacientes, posiblemente abarataría el coste, eliminaría las mínimas molestias observadas y aceleraría la obtención de la dosis necesaria ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). El uso de células de donantes sanos y jóvenes, “posiblemente” nos proporcionaría un medicamento de mayor eficacia.

Con respecto a la recogida de muestras, procesamiento y cultivo celular, el proceso se realizó bajo protocolos diseñados por el equipo investigador y el laboratorio productor siendo aprobados y validados por el CEIC y la AEMPS. El transporte de las muestras se realizó siempre por la misma empresa/persona que había validado el procedimiento para su autorización por la AEMPS (laboratorio productor de la Fundación para la Investigación del Hospital Gregorio Marañón de Madrid; número de autorización: AEMPS-20090211-TA de acuerdo al PEI 04-031); la recogida del lipoaspirado se realizó siempre sobre contenedores validados y suministrados por el laboratorio productor no superando en ningún caso los 45 minutos desde la extracción del tejido adiposo de los pacientes; la muestra siempre fue recepcionada en el laboratorio productor antes de 90 minutos desde su obtención y a una temperatura próxima a los 10°C; se desconoce si realmente el margen temporal es crucial para el posterior procesado pero las pruebas y validaciones previas siempre se realizaron con un margen máximo de 180 minutos desde la extracción hasta la manipulación del tejido adiposo.

Por tanto, se puede afirmar que la terapia celular, entendida como el complejo extracción-cultivo-implante, es una terapia factible y de bajo riesgo siempre y cuando se actúe de acuerdo con la Ley General de Sanidad, la Ley de Garantías y el Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios y según el RD 561/1993 y el RD 223/2004.

Se diseñó un ensayo clínico fase I-IIa que se rige desde el punto de vista ético por la declaración Universal de los Derechos Humanos de 1948, el Código de Nuremberg de 1949, la Declaración de Helsinki y el convenio para la protección de los

derechos humanos y la dignidad del ser humano (BOE 11 Noviembre 1999) y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario la Paz.

Todos los pacientes incluidos en el ensayo clínico fueron citados para una visita de preevaluación en las que se les informó detalladamente del tratamiento a aplicar, recibieron una hoja de información, y varios días después se les recitó para aclarar cualquier posible duda y firmar el consentimiento informado referente al mismo (Anexo 1). Cada paciente recibió copia firmada del consentimiento informado. El ensayo clínico fue registrado en [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) recibiendo el número identificativo NCT01799694 y fue autorizado por la Agencia Española del Medicamento con número de EudraCT 2009-016298-14.

Desde el punto de vista de la seguridad conviene resaltar las implicaciones de la terapia celular en si misma, es decir, una vez han sido implantadas las células en la región esfinteriana. A diferencia de los diversos tratamientos endoscópicos descritos<sup>(24,25)</sup> no se ha evidenciado ningún caso de estenosis y/o rigidez uretral en las zonas de inyección. Tampoco se ha evidenciado ninguna alteración en la calidad miccional ni empeoramiento alguno de la incontinencia. En todos los pacientes se ha realizado previo al implante y en todas las visitas de seguimiento una flujometría que refrendó, de forma objetiva, la ausencia de efectos de la terapia celular sobre la clínica miccional. Además, en la última visita del ensayo se realizó a todos los pacientes una uretrocistoscopia para garantizar la inocuidad de la terapia celular mediante la inyección intrauretral, y la ausencia de cambios con respecto a la uretrocistoscopia que se realiza previa al implante celular. Debe destacarse que en el estudio urodinámico inherente a la evaluación final del ensayo, no se encontró ninguna alteración fisiopatológica ni

deterioro reseñable con respecto al estudio urodinámico basal; por lo que se deduce que la terapia celular no tiene ningún efecto deletéreo sobre la fisiología miccional.

A todos los pacientes se les recogió preimplante y en todas y cada una de las visitas clínicas, cultivos de orina y analíticas completas de sangre. En ningún caso se ha evidenciado ninguna alteración analítica reseñable ni ningún aumento en la tasa de infecciones de orina. Igualmente, en cada visita se han medido las constantes vitales sin evidenciar ninguna alteración reseñable. Por tanto, no se ha evidenciado ningún efecto sistémico de la terapia celular.

A todos los pacientes se les ha realizado en cada visita una anamnesis y una exploración física, haciendo especial hincapié en la posible aparición de nuevos síntomas de cualquier índole, así como del riesgo de cualquier reacción alérgica por remota que pudiera ser. En ningún caso se ha registrado ningún hallazgo digno de mención.

Con respecto al control oncológico, no se ha evidenciado alteración alguna en los niveles de PSA en el seguimiento de ninguno de los pacientes, ni durante el seguimiento según el protocolo del ensayo (12-15 meses) ni en los seguimientos posteriores propios del cáncer de próstata (seguimiento medio tras finalizar el ensayo de 15 meses). Todos los pacientes incluidos en este ensayo cumplían como criterio de inclusión haber sido intervenidos quirúrgicamente de un cáncer de próstata al menos 18 meses antes, y presentar unos niveles de PSA < 0,2 ng/dl (criterio analítico de curación). Dos de los pacientes incluidos habían sido tratados de un tumor localmente avanzado (pT3a), mientras que el resto de un tumor organoconfinado (pT2); lógicamente los

pacientes pT3a fueron incluidos con un periodo desde la intervención quirúrgica de alrededor de 5 años para garantizar la seguridad del paciente. Estos hallazgos sugieren sólidamente que la terapia celular en pacientes seleccionados con criterios de curación no interfiere en la evolución del cáncer de próstata. Es preciso recordar que la seguridad oncológica constituye un tema capital en la terapia celular, siendo varios los estudios que respaldan esta seguridad oncológica y confirman los hallazgos clínicos de este ensayo durante su corto periodo de seguimiento.<sup>(66, 67, 68, 72)</sup>

Como resumen de lo anteriormente expuesto, se puede asegurar que la terapia celular con células madre derivadas de la grasa (ASC) constituye una terapia factible y segura desde todos los puntos de vista, lo cual cumple el objetivo principal de este ensayo.

El número de pacientes no permite realizar ninguna aseveración en términos de eficacia clínica. Probablemente la mejor forma de evaluar la incontinencia urinaria tras prostatectomía radical sea el Test de la Compresa y la valoración subjetiva de las pérdidas de orina con cuestionarios de calidad de vida<sup>(104)</sup>. Desde el punto de vista de los resultados subjetivos se han empleado dos cuestionarios de calidad de vida (SF-36 y ICIQ-SF), sin que aparecieran diferencias estadísticamente significativas con estas herramientas, y la propia percepción del paciente en la anamnesis, donde sí se constataron diferencias significativas en aquellos pacientes respondedores. Es posible que no se hayan empleado las herramientas más sensibles para detectar cambios en la calidad de vida en relación a la incontinencia urinaria, a pesar de ser cuestionarios validados en lengua española ([www.uroweb.org](http://www.uroweb.org)). Desde un punto de vista objetivo se

empleó el número de compresas utilizadas al día, el test de la compresa de 24 hs (Pad Test) y el estudio urodinámico.

Durante el seguimiento se definieron 2 momentos de evaluación de la eficacia terapéutica: una primera evaluación que se realizó a los 3 meses del implante y una segunda evaluación a los 12 meses del implante. El motivo de esta primera evaluación a los tres meses viene definido por la experiencia con los distintos tratamientos endoscópicos para la incontinencia urinaria, en las que habitualmente se podía ver una respuesta positiva durante el primer mes de tratamiento que gradualmente iba desapareciendo tras el efecto *bulking* <sup>(24, 105)</sup>. Se consideró que a los tres meses este efecto habría desaparecido, y por tanto, cualquier mejoría clínica en este momento debería ser consecuencia del efecto de la terapia celular. Tal y como estaba diseñado este ensayo clínico, se realizó una primer inyección de 20 millones de células y se evaluó a los tres meses la eficacia terapéutica; en caso de mejoría clínica sustancial se continuó con el seguimiento hasta cumplir los 12 meses de seguimiento establecidos; en el caso de no evidenciarse mejoría clínica relevante, se procedió a una segunda inyección celular, en este caso con 40 millones de células, reiniciándose el seguimiento durante otros 12 meses (un total 15 meses de seguimiento tras terapia celular para los sometidos a una segunda inyección celular).

Con respecto a la mejoría clínica del 37,5% (3/8 pacientes) mantenida tras mas de 12-15 meses de seguimiento, es importante destacar que en los casos nº 2 y nº 8 en el estudio urodinámico realizado al final del ensayo no se evidenció incontinencia urinaria, lo que refrenda el resultado clínico, mientras que en el caso nº 5 tan sólo fue etiquetado de mejoría respecto al previo. Cabe destacar que en los tres casos con mejoría

objetivable de reducción en más del 50% ( $p < 0,05$ ) de las pérdidas de orina registradas en los Padtest, los tres pacientes refieren una mejoría subjetiva del 70-80% que describen como satisfactoria hasta el punto de no plantearse ninguna intervención quirúrgica para la corrección de la incontinencia urinaria residual. (Tabla 4)

El objetivo principal de este ensayo no es evaluar la eficacia clínica de la terapia celular, luego no se compara la terapia con células madre mesenquimales derivadas de la grasa con otro tratamiento de referencia para la incontinencia urinaria. Cada paciente es comparado consigo mismo desde su situación basal hasta su situación final, y esta comparación ha arrojado diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4). Este hallazgo respalda definitivamente la necesidad de realizar ensayos clínicos diseñados específicamente para evaluar la eficacia clínica de esta nueva arma terapéutica.

La decisión de programar dos dosis celulares es consecuencia de una de las lagunas existentes en relación a la terapia celular, que es la dosis óptima de células a implantar<sup>(106-108)</sup>. Dado que se desconocen las dosis óptimas para su aplicación clínica son necesarios estudios de dosificación del mismo modo que se hacen para los fármacos que se emplean en la práctica clínica habitual. Por este motivo, y dado que la dosis máxima permitida en aquel momento por las autoridades competentes (AEMPS) era de  $40 \times 10^6$  ASC, se optó por un programa de escalada de dosis:  $20 \times 10^6$  en primera inyección y  $40 \times 10^6$  en segunda inyección. No obstante, los resultados obtenidos nos animan a diseñar en el futuro un ensayo clínico de escala de dosis tanto en la dosis celular en sí misma, como en el número de implantes necesarios de una dosis celular dada. Según los resultados de este ensayo se puede considerar un intervalo óptimo entre dosis de tres meses.

Puede afirmarse, que la terapia celular con ASC para la incontinencia urinaria de esfuerzo por déficit esfinteriano tras prostatectomía radical es un tratamiento seguro, factible pero de relativa eficacia, al menos con las dosis empleadas en este ensayo y en un número limitado de pacientes. Durante este estudio se puede concluir que 20 millones de células son probablemente insuficientes, aunque 1 paciente haya tenido una respuesta evidente. Cabe pensar que si el caso nº 5 hubiera sido sometido a una segunda inyección quizá la respuesta clínica sería aún mejor. Del mismo modo, el caso nº 9 quizá hubiera tenido una respuesta mantenida en el tiempo tras una segunda inyección, así como que el fracaso tardío de la terapia pueda estar relacionado con la escasa relevancia basal de su incontinencia de tan solo 4 gr.. Por otro lado, se puede afirmar que una dosis de 40 millones de ASC se acercan a dosis que pudieran ser terapéuticas para incontinencias leve-moderadas, y de relativa eficacia en incontinencias moderadas-severas, que probablemente requieran dosis celulares superiores o inyecciones repetidas. Actualmente se están desarrollando estudios con dosis superiores a un orden de magnitud (200 millones de células) así como dosis repetidas para diferentes patologías con la intención de buscar la dosis y sistema de administración óptimos en cada caso (datos aún sin publicar por diferentes grupos).

Puede asumirse que los resultados clínicos son consecuencia directa de la terapia celular y no consecuencia de un mecanismo físico (efecto bulking) puesto que ha perdurado más allá de los 12 meses del implante celular. Desde este punto de vista, cabe preguntarse las posibles causas del fracaso de la terapia celular en los otros pacientes.



Existen diversas variables que podrían influir en el éxito de la terapia celular:

*1.- Viabilidad celular durante el cultivo, expansión, almacenaje y traslado del material celular.* No parece probable ya que se realizó por debajo de los márgenes que se establecieron para la validación del procedimiento y el laboratorio productor siempre realizaba un análisis de viabilidad previo a la liberación del lote celular siendo, en todos los casos, superior al 98%. Sin embargo, existen incógnitas por aclarar en este ámbito para los futuros estudios como puede ser el método de cultivo y expansión ideal.

*2.- Viabilidad celular tras el implante:* tasa de mortalidad celular, efectos del microambiente celular postimplante, etc. Hay numerosos estudios que coinciden en que el número de células tras el implante disminuye drásticamente a las 24 horas y durante los 7 días postimplante<sup>(67)</sup>, por ello podemos considerar que este es un factor crucial que la comunidad científica debe mejorar para dar respuestas de cómo mejorar la viabilidad de las células postimplante<sup>(83)</sup>. Conocer el mecanismo intrínseco de la integración de la célula trasplantada en un tejido-microambiente dado, debe ser otro objetivo de futuras investigaciones, lo que permitirá aumentar la eficacia de las posibles aplicaciones clínicas.

*3.- Edad del paciente:* En este estudio se utilizaron células autólogas, es conocido que con la edad las células tienen peor “calidad” definida como capacidad de diferenciación y de secreción de factores tróficos<sup>(108,109)</sup>; por ello, estamos ante una población celular que posiblemente cumpla las peores expectativas de rendimiento. La capacidad de las células mesenquimales de permitir una terapia celular alogénica, abre

la posibilidad de emplear células de donantes jóvenes de los que se beneficiarían receptores añosos.

4.- *Origen de la incontinencia:* Stress, nervioso, post-tumor,.... Es posible que la terapia celular sea más o menos eficaz en función de la etiología fundamental.<sup>(108,109)</sup>

5.- *Número de células:* dosis celular. Debe investigarse si la dosis celular necesaria para obtener el efecto clínico deseado difiere en función de la patología a tratar, su severidad, la edad del donante y del receptor, etc.<sup>(69, 106, 107, 108, 110)</sup>

6.- *Número de aplicaciones celulares:* en nuestro estudio se han realizado 2 aplicaciones celulares en algunos pacientes con diferentes dosis; al igual que los medicamentos habituales necesitan pautar unas dosis en el tiempo, quizás la terapia celular necesite una pauta de aplicaciones, aunque probablemente precisen tiempos más espaciados y dosis ajustadas a cada caso.

7.- *Mecanismo de administración:* El grupo de Strasser ha diseñado un mecanismo de administración celular guiada por ecografía transuretral con el objetivo de aumentar la fiabilidad de la administración de las células en el esfínter<sup>(98)</sup>. No existen datos fiables a favor o en contra del apoyo ecográfico o del empleo de la visión directa utilizada en este ensayo. En cualquier caso, es otra variable a tener en cuenta para futuros ensayos clínicos.

8.- *Manipulación celular:* Se trata del primer medicamento vivo, lo cual implica un aprendizaje por parte del personal clínico a la hora de trabajar con el.

Si somos capaces de responder a todas estas cuestiones estaremos en condiciones de ofrecer a nuestros pacientes una terapia para la incontinencia urinaria que es segura, eficiente, efectiva, mínimamente invasiva y duradera.

Se puede afirmar que los resultados de este ensayo clínico constituyen una base suficiente para diseñar ensayos clínicos en fase II, con el objetivo principal de evaluar la eficacia clínica de las células troncales mesenquimales derivadas de la grasa para el tratamiento por vía endoscópica de la incontinencia urinaria tras prostatectomía radical.

## **6.- MIRANDO AL FUTURO**

Diferentes trabajos publicados en la literatura científica han demostrado la capacidad de las ASC de origen animal y humano de reparar daños tisulares in vivo. Se ha comprobado que en modelos animales de inflamación, las ASC son capaces de disminuir el proceso inflamatorio así como controlar la respuesta de los linfocitos T. Las ASC poseen capacidad de diferenciación, con escasa inmunogenicidad y capacidad de modular la respuesta inflamatoria e inmune. Si bien el mecanismo molecular se desconoce con exactitud, sabemos que su uso en tejidos adultos da lugar a la reparación tisular así como a la regeneración de las células dañadas. Asimismo, se ha comprobado la capacidad local de estimulación tisular promoviendo entre otros la neovascularización de los tejidos dañados.<sup>(56,57,60,73,76,77)</sup>

Existen todavía muchas incógnitas en relación al mecanismo de acción de las células madre. Por un lado, es conocida su capacidad de diferenciación en distintas líneas celulares y por tanto su teórica capacidad de reparar el tejido dañado. Por otro lado, sus efectos paracrinos están adquiriendo una mayor relevancia en los últimos años<sup>(78)</sup>. Las Células Madre Mesenquimales liberan mediadores solubles como citoquinas y factores de crecimiento, que tienen efectos a nivel de la citoprotección, angiogénesis, reparación tisular, normalización de la matriz extracelular y alivio de la inflamación.

Por ahora se desconocen con exactitud los mecanismos implicados en estos procesos, así como los posibles efectos adversos de la terapia celular. En nuestro camino de investigación con esta fuente celular hemos ido superando diferentes retos, sin embargo todavía son muchas las incógnitas que debemos aclarar. Parece que el uso autólogo de ASC es seguro, pero cabe preguntarse si es factible su uso de forma

alogénica, lo que ofrecería mayores posibilidades al disponer de una banco de donantes. El uso de células troncales mesenquimales alogénicas debe ser analizado tanto desde el punto de vista inmunológico, de morbilidad y desde el punto de vista de los costes para el erario público.

En cualquier caso, tanto el mecanismo de reparación directa como el mecanismo de reparación paracrina de las Células Madre Mesenquimales (MSC), todavía requieren el desarrollo de ensayos clínicos para alcanzar las máximas cotas de eficacia y seguridad de la Terapia Celular.

Actualmente nuestro grupo lleva a cabo diferentes estudios en fase IIa para valorar la eficacia del producto en pacientes con incontinencia urinaria variando dos aspectos fundamentales: la edad/sexo de los pacientes y la fuente celular. Así, uno de los ensayos estudia la factibilidad y la seguridad de las ASC en el tratamiento de la incontinencia urinaria femenina de esfuerzo, y el otro estudia la factibilidad y seguridad de las células madre derivadas del músculo en el tratamiento de la incontinencia urinaria tras prostatectomía radical en el varón y de la incontinencia urinaria femenina de esfuerzo. Ambos ensayos se encuentran en la actualidad en fase de seguimiento. Dado que los costes de estos tratamientos se reducen progresivamente, debemos tener presente que nuestros pacientes pueden beneficiarse en un futuro próximo de la aplicación periódica de estos tratamientos, incluso en régimen ambulatorio y con el tipo celular mas adecuado, y que esto puede dar lugar a un mejor tratamiento de la incontinencia urinaria rebajando las molestias para los pacientes, así como el coste de esta patología para el Sistema Sanitario.

## **7.- CONCLUSIONES:**

Las principales conclusiones que obtenemos de este ensayo son:

1.- La liposucción como procedimiento para la obtención de células troncales mesenquimales autólogas derivadas de la grasa constituye un procedimiento factible, seguro y con un elevado rendimiento.

2.- El proceso de cultivo y expansión de ASC con los protocolos actuales es seguro y eficaz.

3.- El implante celular por vía endoscópica es un procedimiento factible y seguro.

4.- El uso de células troncales mesenquimales autólogas derivadas de la grasa para el tratamiento de la incontinencia urinaria tras prostatectomía radical es factible y seguro a las dosis empleadas.

5.- La calidad de vida de los pacientes tratados por vía endoscópica no se ve mejorada significativamente en el SF-36.

6.- La eficacia de las células troncales mesenquimales autólogas expandidas derivadas del tejido adiposo (ASC) en la incontinencia urinaria post prostatectomía radical es superior al 35%, según los criterios de este ensayo.



## **8.- BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Malcolm G. Lucas, Ruud J.L. Bosch, Fiona C. Burkhard y cols. "EAU Guidelines on surgical treatment of urinary incontinence" *Eur Urol* 62 (2012): 1118-1129
- 2.- Debra E. Irwin, Ian Milsom, Steinar Hunskaar y cols. "Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study" *Eur Urol* 50 (2006): 1306-1315
- 3.- Hampel C, Wienhold D, Benken N y cols. "Definition of overactive bladder and epidemiology of urinary incontinence" *Urology* 1997; 50 (suppl. 6A):4-17
- 4.- Tubaro A, Carter S, Hind A, y cols. "A prospective study of the safety and efficacy of suprapubic transvesical prostatectomy in patients with benign prostatic hyperplasia" *J Urol* 2001 Jul;166(1):172-6.
- 5.- Madersbacher S, Marberger M. "Is transurethral resection of the prostate still justified?" *Br J Urol* 1999 Feb;83(3):227-37.
- 6.- Nam RK, Herschorn S, Loblaw DA y cols. "Population based study of long-term rates of surgery for urinary incontinence after radical prostatectomy for prostate cancer" *J Urol* 2012 Aug; 188(2):502-6
- 7.- Stephen A. Poon, Jonathan L. Silberstein, Caroline Savage y cols. "Surgical practice patterns for male urinary incontinence: analysis of case logs from certifying American urologist" *J. Urol* July 2012: 188: 205-210
- 8.- Groutz A y cols. The pathophysiology of post-radical prostatectomy incontinence: a clinical and video urodynamic study. *J Urol* 2000;163(6):1767-70
- 9.- Chao R and M.E. Mayo. Incontinence after radical prostatectomy: detrusor or sphinter causes. *J Urol* 1995;154(1):16-8
- 10.- Stefano Arcangeli, Valentina Pinzi and Giorgio Arcangeli "Epidemiology of prostate cancer and treatment remarks" *World J Radiol* 2012 June 28;4(6): 241-246

- 11.- N. Larrañaga, J. Galceran, E. Ardanaz y cols. "Prostate cancer incidence trends in Spain before and during the prostate-specific antigen era: impact on mortality" *Annals of Oncology* 2010; 21 (suppl.3): 83-89
- 12.- National Institutes of Health. Disease-Specific Estimates of Direct and Indirect costs of Illness and NIH report. US Public Health Services, 1997.
- 13.- Murphy G.P. "National patterns of prostate cancer treatment by radical prostatectomy: results of a survey by the American College of Surgeons Commission on Cancer" *J Urol* 1993;152: 1817-1819
- 14.- Walsh P.C. "Editorial: the status of radical prostatectomy in the United States in 1993: where do we go from here" *J Urol* 1994; 152: 1816
- 15.- Prieto Chaparro L. "Radical prostatectomy: usefulness of selective electromyography of the periurethral sphincter in the assessment of urinary incontinence" *Arch. Esp. Urol* 1994; 47(5): 483-7
- 16.- Aenestad O. "Interference pattern in the urethral sphincter: a quantitative electromyographic study in patients before and after radical retropubic prostatectomy" *Scand J Urol Nephrol* 1998; 32(6): 378-82
- 17.- Gemma Vilagut, Montse Ferrer, Luis Rajmil y cols. "El cuestionario de salud SF-36 español: una década de experiencia y nuevos desarrollos" *Gac Sanit* 2005;19 (2):135-50
- 18.- Paul Abrahms, Kerry Avery, Nikki Gardner y cols. "The International Consultation on Incontinence Modular Questionnaire: www.icic.net" *J Urol* 2006 March; 175: 1063-1066
- 19.- S. Hajebrاهيمi, J. Corcos and M.C. Lemieux "International consultation on incontinence questionnaire short form: comparison of physician versus patient completion and immediate and delayed self-administration" *Urology* 2004; 63: 1076-78

- 20.- Jørgensen L, Steen A, Bagger PV y cols. "The one-hour pat-weighing test for assessment of the result of female incontinence surgery" Proc 15<sup>th</sup> Ann Meeting ICS, London: 392-393
- 21.- Jørgensen L., Lose G., Thunedborg P "Diagnosis of mild stress incontinence in females: 24-hour home pad weighing test versus the 1 hour pad test" Neurourol Urodyn 6:165-166
- 22.- Bilal Chughtai, Richard Lee, Jaspreet Sandhu y cols. " Conservative treatment for postprostatectomy incontinence" Rev Urol 2013; 15(2): 61-66
- 23.- Campbell SE, Glazner CM, Hunter KF y cols. "Conservative management for postprostatectomy urinary incontinence" Cochrane Database Syst Rev 2012 Jan 18;1:CD001843
- 24.- Ricarda M. Bauer, Christian Gozzi, Wilhelm Hübner, y cols. "Contemporary management of postprostatectomy incontinence" Eur urol 2011; 59: 985-996
- 25.- Philip H Kim, Laura C. Pinheiro, Coral L. Atoria y cols. " Trends in the use of incontinence procedures after radical prostatectomy: a population based analysis" J Urol 2013 February; 189: 602-608
- 26- Landon Trost and Daniel S. Elliott "Male stress urinary incontinence: a review of surgical treatment options and outcomes" Adv Urol 2012; 2012: 287489
- 27.- Hübner WA and Schlarp OM "Adjustable continence therapy (ProACT): evolution of the surgical technique and comparison of the original 50 patients with the most recent 50 patients at a single centre" Eur Urol 2007; 52: 680-6
- 28.- F. B. Scott "The artificial sphincter in the management of incontinence in male" Urologic Clinics of North America 1978; Vol.5, no. 2: 375-391

- 29.- Frank Van der Aa, Marcus J. Drake, George R. Kasyan y cols. “ The artificial urinary sphincter after a quarter of a century: a critical systematic review of its use in male non-neurogenic incontinence” *Eur Urol* 2013; 63: 681-689
- 30.- Drogo K. Montague “Artificial urinary sphincter: long-term results and patient satisfaction” *Adv Urol* 2012; 2012: 835290
- 31.- Lanza R and Atala A. “Essentials of stem cell Biology” 3<sup>rd</sup> Ed. ISBN-13:978-6124095038
- 32.- Mumerg C, Van der Stolpe A, Roelen B. y cols. “Stem cells: Scientific facts and fiction” 2<sup>nd</sup> Ed. ISBN-13: 978-0124115514
- 33.- Gurdon JB (1962). *Dev Biol* 4:256-273
- 34.- Gurdon J (1962). *J Embryol Exp Morph* 10: 622-640
- 35.- A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja and N. Kulagina “ Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs” *Exp Hem* 1976; 4(no5): 267-274
- 36.-Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M y cols. “Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium” *PLoS ONE* 7(9):e45435. Doi:10.1371/journal.pone.0045435
- 37.- Takahashi K, Yamanaka S. “ Induction of pluripotent stems cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors” *Cell* 2006 Aug 25; 126(4): 663-76
- 38.- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, y cols. “Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells”. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95
- 39.- Alison MR, Islam S, Lim S. “Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly” *J Pathol* 2009;217: 282-98.
- 40.- Grinnemo KH, Sylvén C, Hovatta O, y cols. “Immunogenicity of human embryonic stem cells” *Cell Tissue Res* 2008;331:67-78.

- 41.- Blum B, Benvenisty N. "The tumorigenicity of human embryonic stem cells" *Adv Cancer Res* 2008;100: 133-58.
- 42.- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, y cols. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors" *Cell* 2007;131:861-72.
- 43.- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, y cols. "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells" *Science* 2007; 318:1917-20.
- 44.-Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, y cols. "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors" *Science* 1998;279:1528-30.
- <sup>1</sup> Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, y cols. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells" *Science* 1999; 284:143-7.
- 45.- Hiroshi M. "Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review" *J Nippon Med Sch (Abstract)*2009;76:56-66.
- 46.- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, y cols. "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies" *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
- <sup>1</sup> Schäffler A, Büchler C. "Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies" *Stem Cells* 2007;25:818-27.
- 47.- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, y cols. "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane" *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.
- 48.- Barry FP, Murphy JM. "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization" *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-84.
- 49.- Zuk PA "The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead" *Mol Biol Cell* 2010 Jun 1; 21(11): 1783-7
- 50.- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM (2013). "Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived

stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)” *Cytotherapy* 2013, 15(6): 641-648.

51.- Gimble J and Guilak F. “Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization and differentiation potential” *Cytotherapy* 2003; 5:362-369

52.- Wang M, Crisostomo PR, Herring C, y cols. “Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism” *Am J Physiol* 2006;291:R880-4.

53.- Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, y cols. “Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases” *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5:1571-84.

<sup>1</sup> Fang B, Song Y, Liao L, y cols. “Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease” *Transplant Proc* 2007; 39:3358-62.

54.- Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, y cols. “Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial” *Dis Colon Rectum* 2007; 52:79-86.

55.- Rigotti G, Marchi A, Galiè M, y cols. “Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells” *Plast Reconstr Surg* 2007;119: 1409-22.

56.- Fraser JK1, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. “Adult stem cell therapy for the heart” *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):658-66.

57.- Bacou F, Andalousi RB, Daussin PA, y cols. “Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Increases Mass and Functional Capacity of Damaged Skeletal Muscle” *Cell Transplantation*, 2004 Vol. 13, pp. 103–11.

- 58.- F. Erdö, Bürle, J- Blunk y cols. “ Host-dependent tumorigenesis of embryonic transplantation in experimental stroke” *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 2003; 23 (no.7): 780-785
- 59.- H. Henze, P.L: Soong, S.T. Wang y cols. “Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies” *Stem Cell Research* 2009; 2 (no.3): 198-210
- 60.- Andrea Staack and Larissa V. Rodriguez “Stem cell for the urinary incontinence” *Curr Urol Rep* 2011; 12: 41-46
- 61.- M.S. Rao and M.P. Mattson “Stem cells and aging: expanding the possibilities” *Mechanisms of ageing and development* 2001; 122 (no.7); 713-734
- 62.- M.P. Granger, W.E. Wright and J. W. Shay. “ Telomerase in cancer and aging” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2002; 41: 29-40
- 63.- D. Rubio, J. Garcia-Castro and M.C. Martin “Spontaneous human adult stem cell transformation” *Cancer Research* 2005; 65 (no.11): 3035-3039
- 64.- R. Izadpanah, D. Kaushal, C. Kriedt y cols. “ Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells” *Cancer Research* 2008; 68 (no.11): 4229-4238
- 65.- G. Lepperdinger, R. Brunauer, A. Jaming y cols. “ Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies?” *Experimental Gerontology* 2008; 43 (no.11): 1018-1023
- 66.- S. Garcia, M. C. Martin, R. de la Fuente y cols. “Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells” *Experimental Cell Research* 2010; 316 (no9): 1648-1650



- 67.- Vilalta M., Degano IR, Bago J, y cols. "Biodistribution, long term survival and safety of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells in nude mice by non-invasive bioluminescence imaging" *Stem cells Dev* 2008; 17(5): 993-1003
- 68.- Luc Sensebe and Sandrine Fleury-Cappelleso "Biodistribution of mesenchymal stem/stromal cells in a preclinical setting" *Stem cell Int* 2013; 2013: 678063
- 69.- Fernando de Sa Silva, Paula Nascimento Almeida, João Vitor Paes Rettore y cols. "Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy" *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:758102
- 70.- Ching-Shwun Lin and Tom F. Lue "Stem cell therapy for stress urinary incontinence: a critical review" *Stem Cells Dev* 2012 Apr 10; 21(6): 834-43
- 71.- Hatim Thaker and Arun K Sharma "Regenerative medicine based applications to combat stress urinary incontinence" *World J Stem Cells* 2013 Oct 26; 54(4): 112-123
- 72.- Mariano Garcia-Arranz, Ulises Gomez-Pinedo, David hardisson y cols. "Histopathological analysis of human specimens removed from the injection area of expanded adipose-derived stem cells" *Histopathology* 2010; 56: 979-982
- 73.- Michalis Mastroi, Huey Lin and Techung Lee "Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy" *World stem Cells* 2014 April 26; 6(2): 82-93
- 74.- Zhao W, Zhang C, Jin C y cols. "Periurthral injection of autologous adipose-derived stem cells with controlled-release nerve growth factor for the treatment of stress urinary incontinence in a rat model" *Eur Urol* 2011 Jan; 59(1):155-63
- 75.- Obinata D, Matsumoto, Ikado y cols. "Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model" *Int J Urol* 2011 Dec; 18(12): 827-34

- 76.- Shabbir A; Zisa D; Lin H y cols. "Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299:H1428-H1438
- 77.- Caplan AI and Correa D "The MSC: an injury drugstore" *Cell Stem Cell* 2011 Jul 8; 9(1): 11-5
- 78.- García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, y cols. "Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications". *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(10):1453-68.)
- 79.- Garcia-Olmo D, Trebol J, Herreros D y cols "Treatment of fistulas using adipose-derived stem cells" *Cell Therapy*; Ed. Mac Graw Hill; Madrid 2207
- 80.- Burra P, Bizarro D, Ciccocioppo R y cols. "Therapeutic application of stem cells in gastroenterology: an up-date" *World J Gastroenterol* 2011 Sep 14; 17(34): 3870-80
- 81.- Hart ML, Brun K, Lutz B y cols. "Do we need standardized, GMP-compliant cell culture protocols for pre-clinical in vitro studies involving mesenchymal stem/stromal cells?" *Tissue Sci Eng* 2014; 5
- 82.- Klein G, Hart ML, Brinckmann JE y cols. "Mesenchymal stromal cells for sphincter regeneration" *Adv Drug Deliv Rev* 2014 Oct 27; pii: S0169-409X
- 83.- Herrera-Imbroda B, Lara MF, Izeta A y cols. "Stress urinary incontinence animal models as a tool to study cell-based regenerative therapies targeting the urethral sphincter" *Adv Drug Deliv Rev* 2014 Oct 23; pii: S0169-9
- 84.- Roche R, Festy F and Fritel X "Stem cells for stress urinary incontinence: The adipose promise" *J Cell Mol Med* 2010; 14: 135-142
- 85.- Lin CS, Xin ZC, Deng CH y cols. "Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and culture" *Histol Histopathol* 25: 807-815
- 86.- Fu Q, Song XF, Liao GL y cols. "Myoblast differentiated from adipose-derived stem cells to treat stress urinary incontinence" *Urology* 2010; 75:718-723

- 87.- Rodriguez L, Alfonso Z, Zhang R y cols. "Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells" *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12167-12172
- 88.- Xue S, Zhang HT, Zhang P y cols. "Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury" *Neurosci Lett* 2010 Apr 12; 473(3): 186-91
- 89.- Zhang Y, Luo H, Zhang Z y cols. "A nerve graft constructed with xenogenic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells" *Biomaterials* 2010; 31: 5312-5324
- 90.- Jack G, Almeida F, Zhang R y cols. "Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction" *J Urol* 2005; 174: 2041-2045
- 91.- Zeng X, Jack GS y Zhang R "Treatment of SUI using adipose-derived stem cells: restoration of urethral function" *J Urol* 2006; 175: 291
- 92.- Lin G, Wang G, Banie L y cols. "Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells" *Cytotherapy* 2010; 12: 88-95
- 93.- Wu G, Song Y, Zheng X y cols. "Adipose derived stromal cell transplantation for treatment of stress urinary incontinence" *Tissue Cell* 2011; 43: 246-253
- 94.- Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T y cols. "Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells" *Int J Urol* 2011; 18: 659-666
- 95.- Li GY, Zhou F, Gong YQ y cols. "Activation of VEGF and ERK1/2 and improvement of urethral function by adipose-derived stem cells in a rat stress urinary incontinence model" *Urology* 2012; 80: 953.e1-8

- 96.- Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E y cols. "Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1 year follow-up in 123 patients" BJU Int 2007 Nov; 100(5): 1081-5
- 97.- Mitterberger M., Pinggera GM, Marksteiner R y cols. "Adult stem cell therapy of female stress urinary incontinence" Eur Urol 2008; 53: 169-75
- 98.- Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E y cols. "Myoblast and fibroblast therapy for post-prostatectomy urinary incontinence: 1-year followup of 63 patients" J Urol 2008; 179: 226-231
- 99.- Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E y cols. "Autologous myoblast and fibroblast versus collagen for treatment of stress urinary incontinence in women: a randomised controlled trial" Lancet 2007; 369: 2179
- 100.- Kajbafzadeh AM, Elmi A, Payabvash S y cols. "Transurethral autologous myoblast injection for treatment of urinary incontinence in children with classic bladder extrophy" J Urol 2008; 180: 1098-1105
- 101.- Yamamoto T, Gotoh M, Kato M y cols. "Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: report of three initial cases" Int J Urol 2012; 19: 652-659
- 102.- Gotoh M, Yamamoto T, Kato M y cols. "Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients" Int J Urol 2014 Mar; 21(3): 294-300
- 103.- Kuismanen K, Sartoneva R, Haimi S y cols. "Autologous adipose stem cells in treatment of female stress urinary incontinence: results of a pilot study" Stem Cells Transl Med 2014 Aug; 3(8): 936-41
- 104.- Wallerstedt A, Carlsson S, Nilsson AE y cols. "Pad use and patient reported bother from urinary leakage after radical prostatectomy" J Urol 2012; 187: 196-200

- 105.- Schöder A, Abrams P, Anderson KE y cols. "Guidelines on urinary incontinence. European Association of Urology" 2010 p.11-28
- 106.- Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M y cols. "Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction" *Circulation* 2006; 113: 1311-1325
- 107.- Fiis T, Haack-Sørensen M, Mathiasen A.B. y cols. "Mesenchymal stromal cell driven endothelial progenitor treatment in patients refractory angina" *Scand Cardiovasc J* 2011; 45: 161-168
- 108.- Michalis Matri, Hueylin and Techung Lee "Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy" *World J Stem Cells* 2014 April 26; 6(2): 82-93
- 109.- Dimmeler S and Leri A " Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy" *Circ Res* 2008; 102: 1319-30
- 110.- Gluckman E, Rocha V, Arcese W y cols. "Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice" *Experimental hematology* 2004 vol 32; 4:397-407